

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018

Mateja Filković

937/PI

**PRIMJENA HLADNE PLAZME
PRI KLIJANJU PŠENICE**

Ovaj rad dio je bilateralno hrvatsko-mađarskog projekta pod nazivom „Nove tehnologije u agronomiji temeljene na hladnim plinskim plazma izbojima“.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Tomislave Vukušić.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Tomislavi Vukušić na savjetima i vremenu koje mi je posvetila, na njenom stručnom vodstvu i prijateljskoj podršci.

Hvala roditeljima na omogućenoj prilici za obrazovanje. Hvala najboljem bratu na kontinuiranoj podršci tijekom cjelokupnog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA HLADNE PLAZME PRI KLIJANJU PŠENICE

Mateja Filković, 937/PI

Sažetak: Netermalna plazma pronašla je svoju primjenu u agronomiji. Plazma uzrokuje promjenu na površini sjemena i utječe na ulazak radikala (H_2O_2 , O_3 , OH^\cdot , NO_3^\cdot , NO_2^\cdot) u unutrašnjost sjemena. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj tretmana visokonaponskim pražnjenjem u poticanju klijavosti sjemena. Tretman sjemena Ljetne i Zimske pšenice u destiliranoj vodi provodio se u vremenskom periodu od 10 minuta pri frekvenciji 90 Hz uz 4 radna plina: argon, kisik, dušik i zrak. Nakon tretmana sjeme je inkubirano 6 dana u na 20 °C. Degradacija peroksida u plazma aktiviranoj vodi praćena je zbog provjere stabilnosti i pogodnosti upotrebe kao alternativne zamjene za umjetno gnojivo. Upotrebom radnih plinova kisika i zraka postignuto je 60 % povećanje klice i korijena, dok primjenom argona i dušika 3 do 6 puta povećanje količine ukupnih klorofila. Rezultati impliciraju da hladna plazma poboljšava klijavost sjemena i rast biljke.

Ključne riječi: hladna plazma, visokonaponsko pražnjenje, sjeme pšenice, klorofil, peroksidi, nitriti, nitriti, klijavost

Rad sadrži: 42 stranica, 23 slika, 2 tablice, 39 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. *Tomislava Vukušić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. *Zoran Herceg*
2. doc.dr.sc. *Tomislava Vukušić*
3. dr.sc. *Slobodan Milošević, znan. sav.*
4. prof.dr.sc. *Ksenija Durgo*

Datum obrane: 21. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processing Engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

APPLICATION OF COLD PLASMA IN WHEAT GERMINATION

Mateja Filković, 937/PI

Abstract: Nonthermal plasma is now used in agronomy. Plasma treatment induces changes on the seed surface and allows radicals (H_2O_2 , O_3 , OH^\cdot , NO_3^\cdot , NO_2^\cdot) to penetrate into the seed. The aim of this study was to determine the effect of treatment by high voltage electrical discharge plasma on enhancement of seed germination. The 10 minutes treatment was carried out on distilled water with immersed Spring or Winter Wheat at frequency of 90 Hz using 4 working gases: argon, oxygen, nitrogen and air. After treatment, the seeds were incubated for 6 days at 20 °C. Decomposition of peroxide in plasma activated water was monitored to check the stability and suitability in usage as alternative substitutions for artificial fertilizer. Using oxygen and air as working gases 60 % increase in roots and shoots and using argon and nitrogen 3 to 6 times increase in total chlorophyll levels was achieved. Results imply that cold plasma improves seed germination and plant growth.

Keywords: cold plasma, highvoltage electrical discharge, wheat seed, peroxide, nitrite, nitrate, germination, chlorophyll

Thesis contains: 42 pages, 23 figures, 2 tables, 39 references, 00 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ph. D. *Tomislava Vukušić*, Assistant professor

Reviewers:

1. PhD. *Zoran Herceg*, Full professor
2. PhD. *Tomislava Vukušić*, Full Assistant professor
3. PhD. *Slobodan Milošević*, Scientific Adviser
4. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 21. September 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PLAZMA.....	2
2.1.1. Vrste plazme.....	3
2.1.2. Kemija hladne plazme	3
2.2. PRIMJENA HLADNE PLAZME	5
2.2.1. Primjena u agronomiji	7
2.2.2. Plazma aktivirana voda (PAW).....	7
2.2.3. Utjecaj nastalih spojeva u PAW-u na klijavost sjemena.....	8
2.3. PŠENICA.....	9
2.3.1. Kemijski sastav pšenice	10
2.3.2. Osnovne morfološke specifičnosti	10
2.3.2.1. <i>Korijen</i>	10
2.3.2.2. <i>List – klica</i>	10
2.3.3. Nosioči boje u listu (klici) pšenice – Pigmenti	11
2.3.3.1. <i>Klorofil</i>	11
2.3.4. Fenološke faze pšenice	13
2.3.5. Biološke specifičnosti pšenice	13
2.3.5.1. Razlike između Zimske (Ozime) i Ljetne (Jare) pšenice.....	13
2.3.6. Agroekološki uvjeti za uzgoj pšenice.....	14
2.3.6.1. <i>Temperatura</i>	14
2.3.6.2. <i>Voda</i>	14
2.3.6.3. <i>Tlo</i>	15
2.3.6.4. <i>Gnojidba tla</i>	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	16
3.2. MATERIJALI.....	16
3.2.1. Materijali za tretman visokonaponskim pražnjenjem	16
3.2.1.1. <i>Sjeme pšenice</i>	16
3.2.1.2. <i>Destilirana voda</i>	16
3.2.2. Kemikalije	16
3.2.2.1. <i>Indikatorski listići za određivanje peroksida, nitrita i nitrata</i>	17
3.2.2.2. <i>Titan reagens za određivanje vodikovog peroksida</i>	17
3.2.2.3. <i>Aceton</i>	17

3.2.3.	Izvor plazme – hibridni plazma reaktor	17
3.2.	METODE RADA	19
3.2.4.	Priprema uzorka	19
3.2.5.	Tretman visokonaponskim pražnjenjem	20
3.2.6.	Metoda praćenja klijavosti pšenice	20
3.2.7.	Određivanje ukupnih klorofila u klici proklijale pšenice	21
3.2.8.	Određivanje fizikalno kemijskih parametara u destiliranoj i plazma aktiviranoj vodi.....	22
3.2.8.1.	<i>Određivanje pH-vrijednosti i električne vodljivosti.....</i>	22
3.2.8.2.	<i>Određivanje temperature</i>	23
3.2.8.3.	<i>Određivanje koncentracije peroksida (H₂O₂).....</i>	23
3.2.8.4.	<i>Određivanje koncentracije NO₂, NO₃ u plazma aktiviranoj vodi</i>	24
4.	REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1.	UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA FIZIKALNO KEMIJSKA SVOJSTVA PLAZMOM AKTIVIRANE VODE	26
4.2.	UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA NASTANAK RADIKALNIH SPOJEVA U PLAZMA AKTIVIRANOJ VODI.....	28
4.3.	UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA RAST I RAZVOJ SJEMENA LJETNE I ZIMSKE PŠENICE.....	31
4.4.	UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA RAZVOJ KLOROFILA U KLICI ZIMSKE I LJETNE PŠENICE	34
5.	ZAKLJUČCI.....	37
6.	LITERATURA.....	39

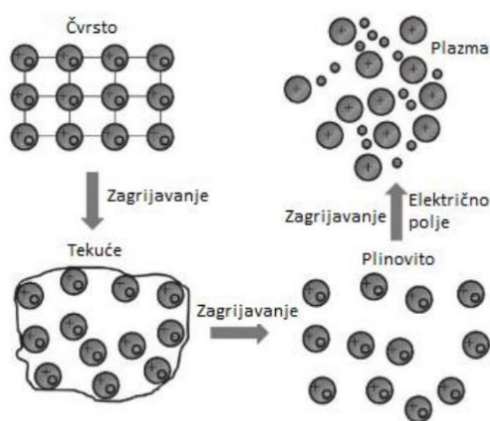
1. UVOD

Pritisak uzrokovan pretjeranim porastom ljudske populacije izazvao je neophodne radikalne promjene i proporcionalan je rastu i razvoju proizvodnog segmenta hrane koji teži svom vrhuncu u svrhu općeg preživljavanja i izbjegavanja ponovne krize gladi. Hladna plazma jedna je od novih metoda koja je pronašla svoju primjenu u agronomiji. Proces se odvija pri niskim temperaturama u kratkom vremenskom periodu, a nastaju produkti bez oštećenja bilo da se radi o hrani, sjemenu ili okolišu. Ova netermalna metoda utječe na smanjenje potrebnih dana klijavosti biljke, povećava rast biljke i kvalitetu agrikulturnih proizvoda (gnojiva). Definira se kao djelomično ili potpuno ionizirani plin sastavljen od elektrona, pozitivno i negativno nabijenih iona, slobodnih radikala, atoma i molekula u osnovnom ili pobuđenom stanju te fotona UV zračenjem. Generiranjem plazma pražnjenja nastaju razni ioni i radikali koji spadaju u reaktivne vrste spojeva, te ovu tehnologiju svrstavaju u napredne oksidacijske procese. Pšenica je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura koja je na drugom mjestu po proizvodnji u svijetu, odmah iza kukuruza. Najvažnija je žitarica u prehrani ljudi. Hladna plazma je efikasna metoda u sprječavanju kontaminacije sjemena, poticanju klijavosti sjemena, proizvodnji prirodnih hranjiva (gnojiva s dušikom), reduciranju patogena (MO) koji mogu kontaminirati sjeme te uklanjanju etilena iz zraka u cilju sprječavanja starenja i neželjenih reakcija posmeđivanja. Hladnom plazmom nastaju mnogi reaktivni spojevi koji dokazano utječu na oksidacijski potencijal, pH-vrijednost i konduktivnost tretirane vode. Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost tretmana hladnom plazmom u poticanju klijavosti sjemena Ljetne i Zimske pšenice, te utjecaja na rast i razvoj istog sjemena. Tijekom istraživanja korištena je izvedba hibridnog plazma reaktora. Procesni parametri su: frekvencija 90 Hz, vrijeme tretiranja 10 minuta uz 4 radna plina (argon, dušik, kisik, zrak). Na plazma aktiviranoj vodi praćen je razvoj peroksida, nitrita i nitrata u svrhu analize prikladnosti proizvedene vode za zalijevanje sjemena kako bi se poticao rast i razvoj klice i korijena, a samim time i klijavost te utjecalo na prinose pšenice u budućnosti. Plazma aktivirana voda posjeduje mehanizam djelovanja sukladan umjetnom gnojivu te koristi kao gorivo za rast i razvoj pojedine biljke. Osim procesa klijavosti, praćen je razvoj ukupnih klorofila na klici sjemena nakon 6 dana inkubacije na 20 °C.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PLAZMA

Grčka riječ *plásma* u slobodnom prijevodu znači samooblikovanje materijala (Mott-Smith i Langmuir, 1926). Osnovna četiri stanja tvari čine čvrsto, tekuće, plinovito stanje te plazma; ionizirani plin koji se sastoji od pozitivno i negativno nabijenih iona i elektrona i neutralnih atoma i molekula. Plazma je kvazineutralni plin, što znači da makroskopski gledano ne posjeduje električni naboj, no sadrži nosioce naboja i kao takav dobro provodi električnu energiju i reagira na elektromagnetska polja (Tendero i sur., 2006). Na Slici 1. prikazan je način prijelaza osnovnih stanja do nastanka kvazineutralnog plina (plazme). Plazmu možemo stvoriti zagrijavanjem plina ili izlaganjem plina jakom elektromagnetskom polju apliciranom pomoću lasera ili generatora mikrovalova. Navedenim načinom dolazi do povećanja ili smanjenja broja elektrona čime se analogno stvaraju pozitivno ili negativno nabijene čestice ioni, uz naravno neizbježnu disocijaciju molekularnih veza. Za svojstvo električne provodnosti plazme odgovorna je prisutnost značajne količine nabijenih čestica, nosača koji dovode do odgovora na elektromagnetsko polje. Električki nabijene čestice u gibanju stvaraju električna i magnetska polja čime se dobiva energija potrebna za daljnju ionizaciju, odnosno nastajanje gotovo potpuno ionizirane tvari – plazme (Tonks, 1967). Plazma kao i plin nema definiran oblik ili volumen, osim ako se ne nalazi zatočena u određenom spremniku. Razlika plazme od plina, pod utjecajem magnetskog polja plazma je sposobna tvoriti strukture koje nalikuju na niti, zrake te dvostruke slojeve (Chu i Lu, 2014).



Slika 1. Prikaz prijelaza stanja materije primjenom topline (prema Chu i Lu, 2014).

2.1.1. Vrste plazme

Prema temperaturi pri kojoj se dobivaju plazme se dijele na termalne (engl. *hot plasma, thermal plasma*) i hladne (engl. *cold plasma, non – thermal plasma*). Termalne plazme dobivaju se primjenom visoke temperature. Primjer ravnotežne plazme je termalna plazma, koju očituje jednako visoka temperatura elektrona i težinski ionskih čestica. Dakle, temperatura svih čestica je jednaka u nekim dijelovima (lokalna termodinamička ravnoteža), što utječe na vrlo visok stupanj ionizacije i razvijanje vrlo visokih temperatura. Najčešća primjena termalne plazme je u postupcima zavarivanja, toplinskog raspršivanja te kao metoda za utvrđivanje metala pri analizi vode (Bogaerts i sur., 2006). Za razliku od termalne, hladna plazma naziva se još i neravnotežna plazma, a razlog tome je što elektroni u hladnoj plazmi imaju višu temperaturu od težinskih ionskih čestica u plazmi. Hladne plazme nastaju pražnjenjem između dvije elektrode priključene na vanjski izvor energije. Moguće je ostvariti uvjete u kojima je temperatura plazme jednaka sobnoj temperaturi, dok je temperatura elektrona znatno viša zbog čega je ovaj tip plazme prikladan za obradu termički osjetljivih materijala (Čunko i Ercegović Ražić, 2010/2011). Za znanstvenu kao i za praktičnu primjenu plazma je vrlo interesantna zbog postizanja visoke temperature i energije te zbog stvaranja visoko energetske pobuđene atoma, a samim time i kemijskih reakcija koje u normalnim uvjetima nisu moguće. Primjenom plazme nastaju egzotične molekule koje ne mogu nastati u normalnim uvjetima, primjerice aluminijev hidrid, mangan monohidrat (Labazan i sur., 2006), titan monohidrat, cink monohidrat ili magnezijev monohidrat (Krstulović i sur., 2006).

2.1.2. Kemija hladne plazme

Za nastanak plazme potrebna je ionizacija, tj. osigurati atomima i molekulama dovod energije iz vanjskog izvora. Kada napon raste, povećava se i naprezanje u atomima, sve do dielektrične granice pri pojavi iskre kada plin prelazi u ionizacijsko stanje. Uz ionizaciju, dolazi i do reakcija disocijacije, ekscitacije, rekombinacije, fragmentacije i drugo (Braithwaite, 2000), a prikaz mogućih reakcija u plazma fazi dvoatomnog plina prikazan je u Tablici 1. Nastanak plazme očituje se vidljivim sjajem, a boja plazme karakteristična je za primijenjeni plin (Hamerli, 2004). Boja nastaje kao rezultat relaksacije elektrona koji prelaze iz pobuđenog u osnovno stanje, pri čemu emitiraju energiju u obliku vidljive svjetlosti (Čunko i Ercegović Ražić, 2010/2011).

Tablica 1. *Primjer mogućih reakcija elektrona, iona i neutralnih čestica u plazma fazi dvoatomnog plina (prema Braithwaite, 2000).*

Reakcije elektrona:	
$e^- + A \rightarrow A + e^- + e^-$	Ionizacija
$e^- + A \rightarrow A^* + e^-$	Ekscitacija
$e^- + A \rightarrow e^- + A^* \rightarrow e^- + A + h\nu$	De – ekscitacija
$e^- + A^* \rightarrow A^+ + e^- + e^-$	Dvostupanjska ionizacija
$e^- + AB \rightarrow A + B + e^-$	Fragmentacija
$e^- + AB \rightarrow A^+ + e^- + B + e^-$	Disocijacija i ionizacija
$e^- + AB \rightarrow A^- + B$	Disocijacija i pridruživanje
$e^- + A^+ + B \rightarrow A + B$	Rekombinacija
Reakcije iona i neutralnih čestica	
$A^+ + B \rightarrow B^+ + A$	Izmjena naboja
$A^+ + B \rightarrow A^+ + B^* + e^-$	Ekscitacija
$A^+ + B \rightarrow A^+ + B^+ + e^-$	Ionizacija
$A^+ + B^* \rightarrow A^+ + B + e^-$	Penning-ova ionizacija
$A^+ + BC \rightarrow A^+ + B + C$	Fragmentacija / disocijacija
$e^- + A^+ + B \rightarrow A + B$	Rekombinacija
$A^\pm + B \rightarrow AB^\pm$	Oligomerizacija

Navedene reakcije nazivaju se primarne i vjerojatnost njihova odvijanja ovisi o energiji elektrona. Produkti nastali u primarnim reakcijama su reaktanti u sekundarnim reakcijama plazme (Whitehead, 2016). Hidroksilni radikal može nastati u primarnim reakcijama disocijacije vode, ali i u sekundarnim reakcijama neutralizacije iona pri čemu nastaju vodikovi radikali. Osim navedenih reakcija, može nastati kao produkt spojeva koji su se formirali u primarnim reakcijama (reakcija kisika i dušika u pobuđenom stanju). Također, nastali radikali (hidroksilni, vodikovi) mogu reagirati i stvoriti stabilne molekule kao što je vodikov peroksid ili voda (Misra, 2016). U sekundarnim reakcijama nastaju i dušikovi oksidi (NO, NO₂, N₂O i N₂O₅). Prva reakcija je rekombinacija dušikovih i kisikovih atoma u formiranje dušikovog (II) oksida. Daljnjim reakcijama dušikov (II) oksid može oksidirati uz pomoć molekularnog kisika ili ozona do dušikovog (IV) oksida. Analogno, dušikov (IV) oksid ulazi u reakcije

rekombinacije s atomom kisika pri čemu nastaju radikalne vrste, kao što je NO_3 koji reakcijom s NO_2 daje dušikov pentoksid N_2O_5 (Misra, 2016). Osim navedenih spojeva, plazma pražnjenjem u plinu koji sadrži kisik nastaje ozon. Izvorni korak uključuje disocijaciju molekule kisika na dva atoma kisika, nakon čega slijedi rekombinacija atoma kisika s molekulama kisika (Misra, 2016).

2.2. PRIMJENA HLADNE PLAZME

Netermalna plazma potencijalna je metoda koja se sve više primjenjuje u prehrambenoj industriji. Primjena plazme u ovom proizvodnom segmentu je raznolika, od dezinfekcije suhe površine hrane (meso, riba, povrće) granula i čestica hrane (bilje i začini) do utjecaja na klijavost sjemenki. Na Slici 2. nalazi se prikaz široke mogućnosti primjene hladne plazme u različitim područjima znanosti i tehnologije. Mogućnost primjene ove nove netermalne tehnologije je izrazito osebujna i raznolika, seže od primjene u svakodnevnom životu do uključivanja u segment proizvodnje u najvažnijim industrijskim granama.



Slika 2. Slikoviti prikaz primjene netoplinske plazme u različitim područjima znanosti i tehnologije (prema Misra, 2016).

2.2.1. Primjena u agronomiji

Ubrzan razvoja života i ljudske populacije na Zemlji utječe na razvoj i primjenu novih tehnika u cilju što brže proizvodnje hrane. Pretpostavlja se da će do 2050. godine broj ljudskih života biti 2 puta veći, potrebno je pronaći nove tehnike za proizvodnju hrane kako bi se prehranili (Misra i sur., 2016). Potrebno je proizvesti ekološki hranjiv proizvod brzo i efikasno, uz smanjenu upotrebu vode i energije prilikom proizvodnje. Zbog pretjerane upotrebe pesticida, fumiganata i agrokemikalija pritiskom uvjetovanim što bržem dobivanju hrane stvorila se rezistencija na mnoge navedene spojeve, što u konačnici rezultira pojavom biorezistentnosti te akumulacijom u masno tkivo ljudi. Potrebno je proizvesti nove tehnologije koje će djelovati na smanjenje izloženosti i apsorpcije toksikanata od samog uzgoja sjemena do ishodne biljke tj. hrane za ljudsku populaciju. Primjena novih tehnologija ne smije za posljedicu težiti nastanku, formiranju kemijskih rezidua u brzo proizvedenoj hrani. Hladna plazma pronašla je svoju primjenu u agronomiji kao jedna od novih metoda na ovom području. Visokonaponsko pražnjenje je proces koji se odvija pri niskim temperaturama, kratko vrijeme sa ili bez minimalnih oštećenja (Misra i sur., 2016). Hladna plazma proizvodi mnoge reaktivne spojeve koji mogu potaknuti rast biljke, klijavost, razvoj pigmentacije u klici tretirane biljke te utjecati na povećanje prinosa biljke. Sprječavajući kontaminaciju sjemena, sterilizacijom površine sjemena i olakšanim ulaskom prirodnog gnojiva na sjeme hladna plazma može potaknuti ulazak poželjnih oksidativnih produkata i analogno potaknuti njihovo vezanje i smanjiti period klijanja, a pozitivno djelovati na rast i razvoj sjemena (Misra i sur., 2016). Dahayal i sur. u svom radu iz 2006. govore o pogodnosti upotrebe hladne plazme u modifikaciji metabolizma sjemena, uzrokujući 50 % ubrzanje, povećanje klijavosti sjemena pšenice nakon tretmana hladnom plazmom, uspoređujući sa ne tretiranim sjemenom pšenice. Povećanje stadija klijavosti pšenice za 6,7 % upotrebom hladne plazme primjenom radnog plina helija proučavali su Jiafeng i sur., 2014. osim klijavosti pratili su i razvoj biljke te uočili povećanje klice i korijena tretirane pšenice.

2.2.2. Plazma aktivirana voda (PAW)

Temperatura prilikom provedbe procesa i ishod željenih produkata u vodi veliki su parametri prilikom proizvodnje plazma aktivirane vode koja upravo ovisno o njima može sadržavati veće koncentracije dušičnih spojeva koji pogoduju rastu i razvoju biljke (Pemen i sur., 2016). Prikaz zamrznute plazma aktivirane vode nalazi se na Slici 3. Voda može biti aktivirana primjenom

plazme direktnim kontaktom s vodom ili unutar tekućine, formiranjem mjehurića u vodi. Plazma aktivirana voda sadrži hidrogen peroksid, nitrite i nitrate. Peroksinitrit nastaje u reakciji nitrita i hidrogen peroksida u kiselim uvjetima, prisutan je samo 15 minuta nakon tretmana (Pemen i sur., 2016). Ovisno o tipu korištenog plina pH-vrijednost plazma aktivirane vode se kreće od kiselog do neutralnog područja. Sastav i koncentracija radikala kod plazma aktivirane vode dokazano posjeduju antimikrobni utjecaj protiv bakterija, biofilмова, plijesni i mikroorganizama (Pemen i sur., 2016). Plazma aktivirana voda se može koristiti kao prirodno gnojivo u poticanju klijavosti i stimulaciji rasta biljke (Pemen i sur., 2016).



Slika 3. *Prikaz zamrznute plazma aktivirane vode (vlastita fotografija).*

2.2.3. Utjecaj nastalih spojeva u PAW-u na klijavost sjemena

Primjenom hladne plazme kao posljedica u plinskoj fazi nastaju reaktivni kisik (ROS) i dušik (RNS) koji u konačnici dovode do prisutnosti istoimenih plinova u vodi (Pamen i sur., 2016). Ovisno o upuhivanom plinu (zrak, kisik, dušik, argon) stvara se velik broj različitih radikala ($N\cdot$, $O\cdot$, $H\cdot$ i $OH\cdot$) koji mogu međusobno reagirati i stvoriti stabilne molekule H_2 , H_2O_2 , H_2O , NO_2 , HNO_2 , HNO_3 od kojih je najstabilniji vodikov peroksid (H_2O_2) (Jiang i sur., 2014). Slobodni radikali su fragmenti molekula koji sadrže jedan ili više nesparen elektron u orbitalama. Slobodni radikali „napadaju“ najbližu stabilnu molekulu te joj uzimaju elektron, a molekula s izgubljenim elektronom time postaje slobodni radikal čime započinje lančana reakcija nastajanja radikala (Zang i sur., 2017). Negativan učinak radikala može se uspješno stabilizirati primjenom antioksidansa, primjerice enzimski antioksidansi prevode oksidirane produkte u vodikov peroksid koji u našem slučaju upijanjem potječe brži razvoj sjemena.

Koncentracija hidrogen peroksida (ROS) veća je primjenom hladne plazme. Kada je u pitanju RNS u vodi, veća koncentracija se postiže primjenom viših temperatura pri kojima dolazi do razgradnje peroksida i peroksinitrita, izomera nitrata koji je veoma nestabilan, analogno efikasnija je upotreba termalne plazme. Plazma aktivirana voda je na ovaj način obogaćena dušičnim spojevima, nitratima koji se mogu koristiti kao prirodno gnojivo i potaknuti klijavost i rast biljke. Najdjelotvorniji je učinak postignut kombinacijom oba tipa plazme (Pamen i sur., 2016).

2.3. PŠENICA

Pšenica pripada redu *Poales*, porodici *Poaceae* (trave), potporodici *Pooideae* (klasaste trave), rodu *Triticum*, koji je najopsežniji i najbogatiji rod kod svih žitarica. Ova najznačajnija ratarska kultura kojom je zasijano 23 % obradivih površina na svijetu koristi se u mlinarstvu, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, osnovna je sirovina za proizvodnju pšeničnog kruha koji konzumira 70 % stanovništva (Ilić, 2014). Naziv žito udomaćen je u onim krajevima gdje se pšenica koristila isključivo kao krušno žito (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2004).



Slika 4. Klas pšenice (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2004).

Iz posijanog zrna pšenice razvijaju se 1 do 1,5 m visoke vlati koje se u vrijeme zriobe oboje zlatno-žute. Na vrhu vlati nalazi se klas, spljoštena vretena, teško lomiv i građen u cik-cak liniji. Na Slici 4. je prikaz klasa pšenice neposredno prije žetve. Postoje ljetne (jare) i zimske (ozime) pšenice, što ovisi o vremenu uzgoja i vršenja. Ozima pšenica zauzima veće površine i u

prosijeku daje veće i stabilnije prinose, analogno veći ekonomski značaj. U Hrvatskoj veću važnost ima ozima pšenica (Šarčević i sur., 2000).

2.3.1. Kemijski sastav pšenice

Sadržaj vode u zrnu kreće se u granicama od 10 do 14 %, ne smije prelaziti 15 % jer se tada stvaraju nepovoljni uvjeti za rast, odnosno dolazi do zasićenja i mogućeg razvoja bolesti koje utječu na rast i razvoj. Mast u zrnu zauzima 1,5 do 2 %, najvećim dijelom smještena je u klici. Procesom mljevenja se odvaja od klice pa se tako produžuje rok trajnosti brašna. U udjelu od 2 do 3 % nalazi se celuloza, koja je veća u pšenica uzgajanih u vlažnijim krajevima. Ugljikohidrati čine najvećih 64 do 69 %, smješteni su u endospermu, a škrob je glavni sastojak. Što se tiče bjelančevina, kod ozimih pšenica je broj nešto manji od jarih, ovdje je suprotno nego kod celuloze, vlažno tlo nije pogodno za razvoj ovog makronutrijenta. Vitamina ima najviše u klici to su B kompleksi, ali i nešto manje u ostalim dijelovima zrna. Od mineralnih tvari ističu se fosfor u najvećem omjeru, kalij, kalcij, magnezij, silicij i željezo (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2004).

2.3.2. Osnovne morfološke specifičnosti

2.3.2.1. Korijen

Korijen pšenice je žiličast. Primarno (klicino) korijenje pojavljuje se u vrijeme klijanja sjemena. Ozima pšenica najčešće klija s tri, a jara s pet korjenčića. Navedeno primarno korijenje je osnovno do procesa busanja. Sekundarno korijenje izbija pri optimalnim uvjetima tek oko tri tjedna nakon nicanja i to iz čvora busanja. Optimalna temperatura za rast i razvoj korijena je 20 °C, s optimalnom vlažnošću oko 60 %, povećanje vlažnosti negativno se odražava na rast i razvoj (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2004).

2.3.2.2. List – klica

List se sastoji od plojke i rukavca između kojih su jezičak i uške. Plojka kod pšenice je duga i linearna, najrazvijeniji su gornji i srednji listovi. Za prinos su najznačajniji drugi gornji listovi, koji su najčešće i najrazvijeniji (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2004). Klijavost sjemena se određuje standardnim metodama, najčešće sjeme klija na nekoj sterilnoj podlozi (pijesak, filter

papir), pri optimalnoj temperature za određenu vrstu uz konstantnu vlažnost (Milohnić, 1966). Tako određena klijavost sjemena proizvođaču ne znači puno, jer stvarna klijavost u prirodnim uvjetima je redovito manja. Na klijavost sjemena i razvitak klice u prirodnim uvjetima utječu osim nasljednih karakteristika sjemena i neizbježni patogeni mikroorganizmi (Milohnić, 1966). Klijanje inducirano nepovoljnim vremenskim uvjetima praćeno je povećanjem aktivnosti alfa amilaze i drugih hidrolitičkih enzima, koji razgrađuju škrob i proteinske rezerve u endospermu samim time smanjuju kakvoću zrna i čine ga neprikladnim za prerađivačku industriju (Šarčević i sur., 2000). Prema članku (Bošković, 2018) lišće (klice) mlade pšenice sadrži vitamine, minerale, enzime, aminokiseline i velike količine klorofila (čak 70 %), a procjenjuje se da 1 žličica praha mlade pšenice u neto masi od 3 g sadrži istu količinu nutrijenata kao i pola kilograma organski uzgojenog voća ili povrća. Dokazano je da klorofil ima sličnu strukturu kao hemoglobin, zbog toga se klorofil često predstavlja kao krv biljaka. Visok sadržaj klorofila u lišću mlade pšenice djeluje detoksicirajuće pročišćavajući jetru, stanice, tkiva i krv.

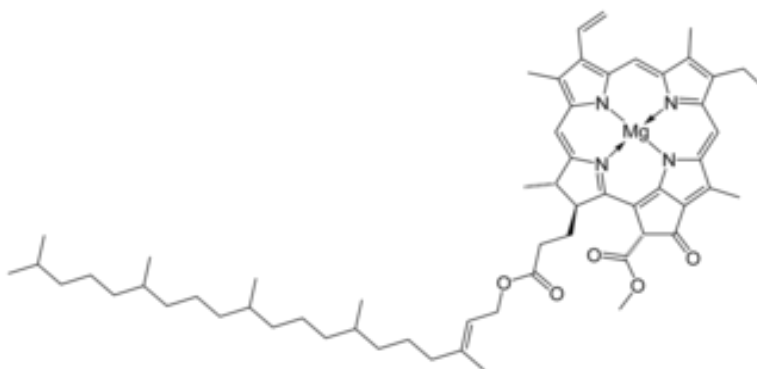
2.3.3. Nosioci boje u listu (klici) pšenice – Pigmenti

Pigmenti su prirodne tvari, nosioci boje, a nalaze se u stanicama i tkivima biljaka. Upravo oni su zaslužni za privlačan izgled voća i povrća. Žute i narančaste boje potječu od karotenoida, crvene i plave i ljubičaste potječu od flavonoidnih spojeva, zelena boja potječe od klorofila koji je zadužen za fotosintezu, tj. disanje. Boja služi kao parametar kvalitete voća i povrća, a posljedica je prisutnosti prirodnih pigmenata koji su vrlo podložni kemijskim promjenama što dovodi do zrenja voća. Na stabilnost pigmenata utječu mnogi faktori poput svjetlosti, kisika, teških metala, temperature, pH, aktiviteta vode. Jedna od najraširenijih grupa pigmenata spada u grupu porfirina. Porfirin se nalazi u obliku klorofila u zelenim biljkama (Anonymus, 2012).

2.3.3.1. Klorofil

Klorofil je pigment zelenih biljaka, algi i fotosintetskih bakterija, topiv u uljima, odgovoran je za proces fotosinteze. Nalazi se u kloroplastima te uz sunčevu energiju koja se pretvara u kemijsku posredstvom ATP-a i NADPH prevodi ugljikov dioksid i vodu u jednostavni šećer (glukozu) i kisik. Najviše je zastupljen u stanicama listova te je odgovoran za prepoznatljivu zelenu boju. Boja nije uvijek analogna klorofilnom sastavu (Bojović, Stojanović, 2005). U biljkama se može nalaziti u različitim oblicima kao klorofil a, b, c, d. Ono što ih čini različitim je struktura. Klorofil a i b se u zelenim biljkama nalaze u omjeru 3:1. Omjer je odraz rasta i

razvoja biljke i ekoloških vanjskih utjecaja (Bojović, Stojanović, 2005). Klorofil a sadrži metil grupu i plavo-zelene je boje, dok klorofil b sadrži formil grupu i žuto-zelene je boje. Klorofil a jedini sudjeluje u pretvorbi sunčeve energije u kemijsku, ostali oblici klorofila apsorbiraju svjetlost te prenose energiju na klorofil a. U algama je prisutan i klorofil c i d (Jašić, 2013). Molekula klorofila sastoji se od porfirinskih prsten koji je građen od 4 pirolna prstena s prisutnošću atoma magnezija u sredini (Anonymus, 2012), prikaz strukture klorofila nalazi se na Slici 5.



Slika 5. *Struktura klorofila (prema Anonymus, 2012).*

Slabim nekovalentnim vezama klorofil je vezan za karotenoide, lipide i lipoproteine, koje pokazuju izrazito nepovoljna strukturna svojstva, sklonost pucanju. Prilikom procesa fotosinteze u stanicama klorofil je zaštićen od svjetla jer ga okružuju karotenoidi i lipidi, ali kada klorofil izgubi zaštitu bilo zbog starenja biljke, ekstrakcije pigmenata iz biljke, oštećenja stanice tijekom procesiranja ili degradacijom posredstvom svjetla vodi do nastanka produkata kao što su mliječna, limunska kiselina, alanin, glicerol (Jašić, 2013). Do same promjene boje dolazi kada se Mg ion iz porfirinske jezgre zamjeni atomom vodika pri čemu nastaje feofitin, maslinasto-smeđe boje (Jašić, 2013). Najveću koncentraciju klorofila, proteina, vitamina i minerala pšenica posjeduje u stadiju koji prethodi klasanju, odnosno stadij prije nego se list (klica) počne izduživati i stvarati stabljiku (Naturela.hr, 2012). Klasanje je fenološka faza u kojoj klas izlazi iz lisnog rukavca, formiranje klasa počinje vrlo rano, u početku bokorenja. Kod ozime pšenice formiranje elemenata klasa (vreteno, klasci i cvjetovi) započinje rano u proljeće (Nastić, 2014). Ovaj stadij predstavlja vrhunac biljnog vegetativnog razvoja i upravo tada rastu svi čimbenici uključeni u fotosintezu i metabolizam biljke. Nakon klasanja, iz listova se formiraju stabljike koje se nastavljaju izduživati, sadržaj klorofila, proteina i vitamina značajno opada dok istovremeno raste sadržaj celuloze koja osigurava strukturnu stabilnost biljke

(Naturela.hr, 2012). Količina klorofila varira od 0,05 do 0,30 %, uobičajeno 4 – 5 mg/100g u listu pšenice (Bojović, Stojanović, 2005). Sadržaj klorofila se može koristiti kao mjera zasićenosti tla dušikom i gnojivom (Tejada – Zarco., 2004). Pigmentski sastav (klorofil) jedan je od fotosintetskih parametara na osnovi kojih se može pratiti produktivnost i razvoj biljke. Od svih makronutrijenata pšenica ima najveću potrebu za dušičnim spojevima (Bojović, Stojanović, 2005). Količina dušika u zelenom bilju povezana je s klorofilnim sastavom i procesom fotosinteze (Haboudane, 2002). Degradacija klorofila ovisna je o pH tkiva, klorofil pokazuje svojstvo visoke stabilnosti u alkalnom mediju (Jašić, 2013).

2.3.4. Fenološke faze pšenice

Fenološke faze koje biljka prolazi u svom životnom ciklusu su: bubrenje i klijanje, nicanje, ukorjenjivanje, busanje, vlatanje, klasanje, cvjetanje i oplodnja, formiranje, nalijevanje i sazrijevanje zrna (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2004).

2.3.5. Biološke specifičnosti pšenice

2.3.5.1. Razlike između Zimske (Ozime) i Ljetne (Jare) pšenice

Osim prijašnje navedenih razlika s obzirom na prinos i samim time ekonomsku, cjenovnu stabilnost, postoje razlike s obzirom na otpornost, dužinu vegetacije, vrijeme sjetve, busanje, otpornost na visoke temperature i sušu, kvalitetu zrna te dužinu stadija jarovizacije. Ozima pšenica ima dužu vegetaciju od jare pšenice, jače busa, otpornija je na niske temperature te posjeduje znatno duži stadij jarovizacije. Stadij jarovizacije odvija se u vegetacijskom razdoblju, ističe sposobnost ozime pšenice da se prilagodi dovoljno niskoj temperature kako bi u proljeće mogla klasati. Za dobro provedenu jarovizaciju neophodan je kisik, niska temperatura (2-5 °C) te svjetlost, trajanje je 30 do 50 dana (Ilić, 2014). Stadij razvoja pod nazivom jarovizacija obuhvaća fenološke faze: klijanje, nicanje, tri lista i busanje (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2004). Analogno tome, jara pšenica je otpornija na visoke temperature i sušu i daje kvalitetnije zrno i nutritivno bogatije brašno. Jara pšenica se sije u proljeće, dok ozima u jesen te prezimljuje u fazi od nicanja do busanja (Ilić, 2014).

2.3.6. Agroekološki uvjeti za uzgoj pšenice

2.3.6.1. Temperatura

Pšenica je kultura kontinentalne klime, samim time najpovoljnija temperatura za njezino klijanje i nicanje je između 14 i 20 °C, te pri navedenoj temperaturi niče u periodu od 5 do 7 dana. Ako je temperatura nešto niža i iznosi od 7 do 8 °C, proces klijanja će se produžiti i iznositi će 17 do 20 dana. Analogno tome, proces klijanja i temperatura prilikom inkubacije procesa su u obrnuto proporcionalnom odnosu. Jako niske temperature, primjerice -20 °C, može podnijeti pšenica ako ima razvijena dva do tri lista uz dobru ukorijenjenost i dostatan visok izvor minerala potrebnih za rast i razvoj (Ilić, 2014). Vrijeme sjetve ozime pšenice igra veliku ulogu u njezinoj otpornosti na mraz, biljka nije strukturno razvijena da podnese veliko oštećenje, te je potrebno uskladiti vrijeme sjetve, ne pre rano niti pre kasno (Ilić, 2014). Optimalne temperature za klijanje sjemena i razvitak mladih biljaka nisu jednake optimalnim temperaturama za razvitak patogenih mikroorganizama u tlu te ovise o brzini klijanja (Milohnić, 1966).

2.3.6.2. Voda

Zrno da bi klijalo mora upiti 50-65 % vlage na svoju masu. Kombiniranjem navedenih parametara temperature i vlage kroz 2 do 3 dana zrno bi trebalo nabubriti i pokazati sposobnost klijanja. Brzina i količina upijene vode u procesu bubrenja ovise o fazi razvoja (zrelosti) zrna. Staklava zrna sporije upijaju vodu od brašnavih, a sitna brže od krupnijih (Nastić, 2014). Pojačana koncentracija soli u zemljištu (uzgoju) utječe na smanjenje klijavosti (Nastić, 2014). Potreba za vodom je najveća u vrijeme nicanja. Kada sjeme nabubri u njemu se događa niz složenih biokemijskih procesa povezanih s aktiviranjem enzima koji iniciraju hidrolizu škroba, bjelancevina i masti kako bi klici omogućili potrebne hranjive sastojke za rast i razvoj (Nastić, 2014). Pri optimalnoj vlažnosti klijavost ovisi o temperaturi. Upravo iz tih razloga, klijavost i energiju klijanja sjemena potrebno je ispitati prilikom različitih temperaturnih uvjeta u kojima se nalazi sjeme (Milohnić, 1966).

2.3.6.3. Tlo

Pšenica je biljka vrlo zahtjevna glede plodnosti i fizičkih svojstava, odgovaraju joj tla poput crnice, aluvijalna bez prisutnosti podzemnih voda. Ako se odlučite na uzgoj pšenice na nekome drugom tlu, potrebna je visoka doza umjetnih gnojiva ako želite postići visoki prinos. Pokazuje sklonost prema dubokim, blago kiselim oranicama (pH 6,5 – 7), umjereno vlažnim te nadasve bogatom humusu (više od 2 %) (Ilić, 2014).

2.3.6.4. Gnojidba tla

Gnojidba tla jedno je od osnovnih procesa prije sjetve, ali i tijekom rasta biljke. Za ovaj proces najpogodnije su primjese s visokim izvorom dušika, fosfora i kalija. Kombinacija ovih elemenata osigurava dobar prinos pšenice, a ne osiromašuje tlo već potječe njegovu efikasnost i plodnost. Najčešće se koriste mineralna gnojiva kao što su: NPK 15-15-15, NPK 13-10-12, NPK 8-26-26 ili NPK 10-30-20 (Milohnić, 1966). Gnojidba se može odvijati u nekoliko faza: Predsjetvena gnojidba – priprema tla za sjetvu; Osnovna gnojidba – osiguravanje biljci dovoljne količine hranjiva; Prihranjivanje u vegetaciji – dodavanje dušika u nekoliko navrata (Korektivna prihrana) (Ilić, 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti kako tretman visokonaponskim pražnjenjem uz upotrebu različitih radnih plinova (dušik, kisik, argon, zrak) utječe na klijavost te rast i razvoj sjemena pšenice. Mjerenje i vaganje klice i korijena provedeno je nakon inkubacije sjemena pšenice 6 dana na 20 °C. Metoda ekstrakcije te analize ukupnih klorofila provedena je u cilju određivanja koncentracije pigmenata odgovorih za zelenu boju lista pšenice. Jedan od ciljeva bio je utvrditi kako tretman visokonaponskim pražnjenjem utječe na stabilnost vode, te formiranje pogodnih spojeva u plazma aktiviranoj vodi. Analize su provedene na plazma aktiviranoj vodi koja je nakon tretmana skladištena na sobnoj temperaturi kako bi se pratio razvoj i degradacija peroksida kao produkta ovog procesa, a pogodnog za poticanje rasta i razvoja sjemena pšenice, s metaboličkom funkcijom analognoj umjetnom gnojivu.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Materijali za tretman visokonaponskim pražnjenjem

3.2.1.1. Sjeme pšenice

Prilikom izvedbe rada korišteno je sjeme Ljetne (Chinese Spring AN 2717 spring wheat) i Zimske (Chinese Spring AN 2653 winter wheat) pšenice. Korišteno je sjeme s Agricultural Institute, Centre for Agricultural Research, Martonvásár, Hungary.

3.2.1.2. Destilirana voda

Za potrebe eksperimenta korištena je destilirana voda koja je dobivena postupkom deionizacije te čija je električna vodljivost manja od $2,1 \mu\text{s cm}^{-1}$, s pH 6,01

3.2.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće.

3.2.2.1. Indikatorski listići za određivanje peroksida, nitrita i nitrata

Quantofix Peroxyde 25, Quantofix Nitrate / Nitrite test strips, Macherey-Nagel Germany

3.2.2.2. Titan reagens za određivanje vodikovog peroksida

SASTAV: titan (IV) oksid, sumporna kiselina (1:1), destilirana voda.

PRIPREMA: Titan test reagens se izradio otapanjem 1 g titanij praha; titan (IV) oksida (Sigma Aldrich, CAS: 13463-67-7) u 100 mL vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa se zatim zagrijava na oko 190 °C i miješala kroz 20 h. Titanij je otopljen kada inicijalno bijela otopina postane prozirna. Nakon što se sav titanij otopio, reagens otopina se hladila na sobnoj temperaturi i razrijedila na volumenu od 500 mL destiliranom vodom.

3.2.2.3. Aceton

Aceton (dipropanon, dimetil-keton, propan-2-on, 2-propanon, $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$, $\text{H}_3\text{C-CO-CH}_3$) je najjednostavniji i najvažniji alifatski keton.

PRIPREMA: Proces proizvodnje 80 % acetona provodio se razrjeđivanjem 100 % acetona. Proces razrjeđivanja provodio se miješanjem 80 mL 100 % acetona s 20 mL destilirane vode. Potom se otopina za ekstrakciju skladištila na sobnoj temperaturi.

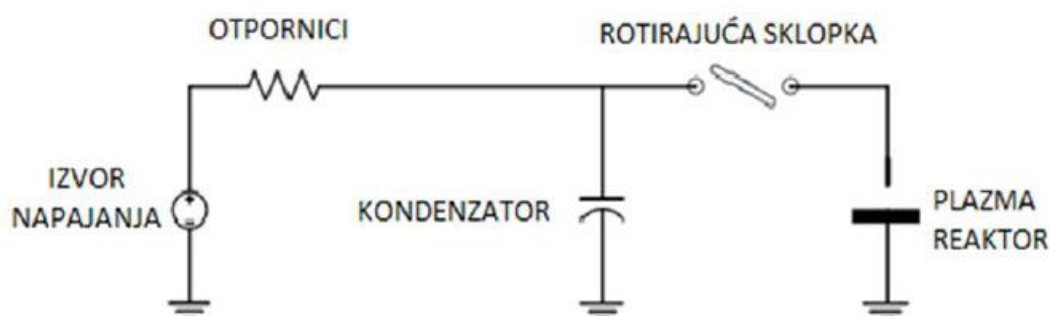
3.2.3. Izvor plazme – hibridni plazma reaktor

Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (*Spellman, UK*), Slika 6. Strujni krug se sastoji od visokonaponskog napajanja, 2 elektrolitska kondenzatora kapaciteta 0,75 nF, serijski spojenih otpornika od ukupno 9,5 MΩ, rotirajuće sklopke tzv. „spark – gap” komore spojene na elektromotor s regulatorom frekvencije, te kontrolne jedinice napajanja.



Slika 6. Sustav za generiranje plazme u tekućini visokonaponskim pražnjenjem: A) reaktor, B) pumpa, C) visokonaponski generator, D) kontrolna jedinica za napajanje, E) otpornici 9,5 M Ω , F) kondenzator 0,75 nF, G) rotirajuća sklopka, H) elektromotor s regulatorom frekvencije (arhiva Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo).

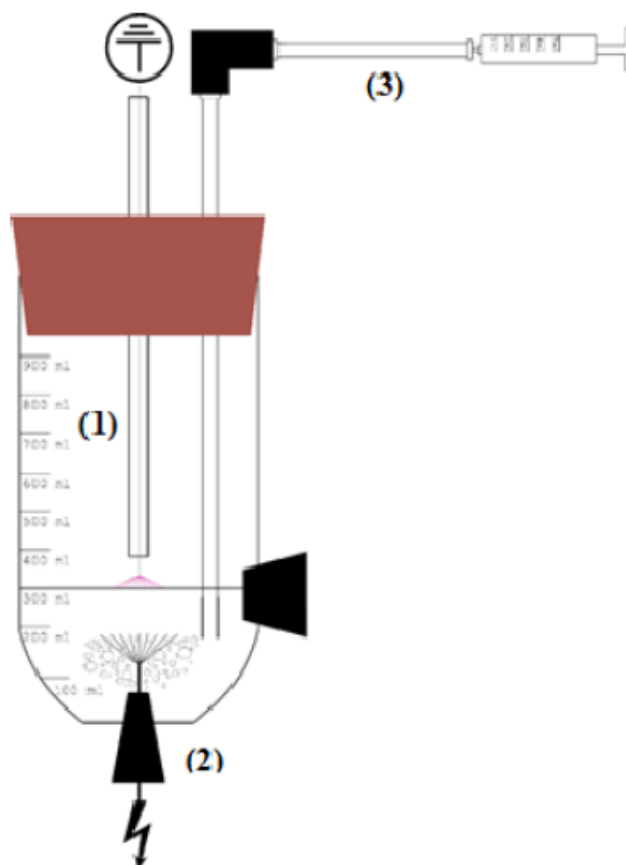
Napon je mjeran naponskom sondom Tektronix P6015A spojenom na osciloskop Hantek DS05202BM. Hibridni plazma reaktor ukupnog je volumena 500 mL, radnog volumena 200 mL, s gumenim čepom i prilagođenim otvorima za elektrode i upuhivanje plinova, Slika 7.



Slika 7. Shema strujnog kruga s pulsirajućim izvorom napajanja (vlastita shema).

Prilikom tretmana kroz visokonaponsku elektrodu igla od nehrđajućeg čelika Microlance TM (3,81 cm) koja je postavljena s donje strane reaktora upuhivani su plinovi: argon, kisik, dušik i zrak protoka 6 L/min koju su ujedno sprječavali lijepljenje sjemeni za stijenku reaktora. S

gornje strane reaktora uvedena je elektroda za uzemljenje. Ovaj tip reaktora, Slika 8. omogućuje pojavu pražnjenja na vrhu elektrode u tekućini te po površini, šire se po mjehurićima upuhivanog plina na površini tekućine.



Slika 8. Hibridni plazma reaktor: (1) - elektroda uzemljenja; (2) – visokonaponska elektroda, igla s otvorom za upuhivanje plina); (3) – uzorkovanje (vlastita shema).

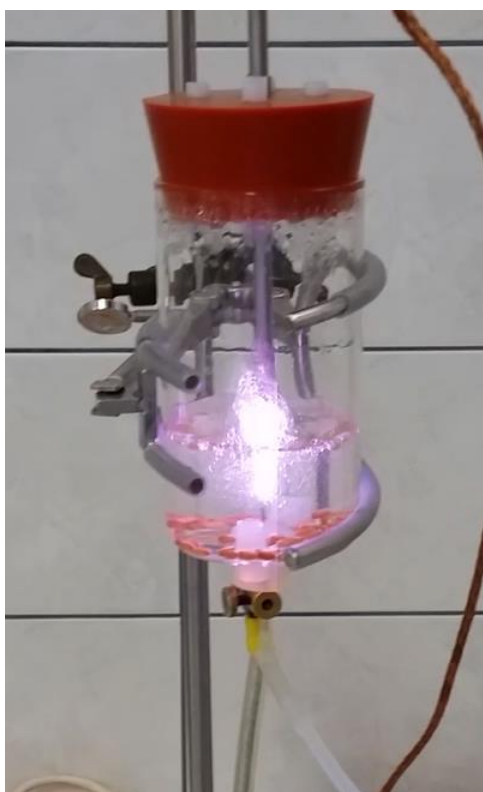
3.2. METODE RADA

3.2.4. Priprema uzorka

Proces pripreme sjemena Ljetne (Chinese Spring AN 2717 spring wheat) i Zimske pšenice (Chinese Spring AN 2653 winter wheat) provodio se brojanjem istoimenog sjemena. Korišteno je sjeme je s Agricultural Institute, Centre for Agricultural Research, Martonvásár, Hungary. Broj uzorkovanja ovisno o vrsti iznosio je 100 sjemenki, ovisno o tipu radnog plina. Ukupno je utrošeno 400 sjemenki Ljetne i 400 sjemenki Zimske pšenice.

3.2.5. Tretman visokonaponskim pražnjenjem

100 zrna Ljetne (Chinese Spring AN 2717 spring wheat) i 100 zna Zimske (Chinese Spring AN 2653 winter wheat) pšenice sa 130 mL destilirane vode podvrgnuto je 10 minutnom tretmanu visoko naponskog pražnjenja, Slika 9. Proces se ponavljao 4 puta jer su se koristile 4 vrste plina, a to su: argon, kisik, dušik i zrak s protokom 6 L/min. Svi plinovi su čistoće 99,99 % (Messer Croatia, Hrvatska). Ostali parametri procesa: pozitivni polaritet, 25-30 kV, frekvencija 90 Hz. Elektroda uzemljenja je od nehrđajućeg čelika i nalazila se s gornje strane reaktora. Udaljenost između elektroda iznosila je 1,5 cm.



Slika 9. Tretman visokonaponskog pražnjenja uz radni plin Argon, uzorak destilirana voda i sjeme Ljetne pšenice (vlastita fotografija)

3.2.6. Metoda praćenja klijavosti pšenice

Proces praćenja klijavosti Ljetne (Chinese Spring AN 2717 spring wheat) i Zimske (Chinese Spring AN 2653 winter wheat) pšenice provodili smo na sterilnoj podlozi – filter papiru (Slika 10, 11.). Filter papir se pokazao kao najpogodniji oblik uzgoja jer u konačnici nakon uzgoja sjemena na ovaj način klica i korijen ostaju u ravnoj formi i lakše ih je izmjeriti bez da dođe do

oštećenja (Slika 11.). Nakon provedenog procesa izlaganja sjemena s vodom hladnoj plazmi sjeme se poredalo u filter papir veličine 28 * 29 cm, dodalo se 4 mL tretirane vode, ovisno o tipu plina i vrsti pšenice u Erlenmayerove tikvice te odložilo na inkubaciju 6 dana na 20 °C. Nakon 6 dana provedeno je mjerenje i vaganje klice i korijena (Slika 11.). Na temelju dobivenih rezultata donesen je sud o utjecaju pojedinog plina na klijavost pšenice.



Slika 10. *Sjeme Ljetne pšenice nakon inkubacije 6 dana na 20 °C (vlastita fotografija).*



Slika 11. *Postupak provođenja mjerenja klice i korijena Ljetne pšenice, nakon inkubacije 6 dana na 20 °C (vlastita fotografija).*

3.2.7. Određivanje ukupnih klorofila u klici proklijale pšenice

Metoda kojom se određivao klorofil u klicama ljetne i zimske pšenice temeljila se na ekstrakciji u 80 % acetonu. Nakon 6 dana inkubacije na 20 °C provedeno je mjerenje, odvajanje klice od

sjemena, vaganje, usitnjavanje te u konačnici ekstrakcija u 10 mL 80 % acetonu (Slika 12.). Kako bi poboljšali ekstrakciju ukupnih pigmenata uzorci su podvrgnuti 10 minutnom tretmanu na tresilici Vorteks (IKS, Vortex 4 basic; BV), te 5 minutnom centrifugiranju na Centrifuga (Hettich, Rotofix 32), na 2 500 okretaja i 10 °C sve u cilju postizanja bolje separacije i izolacije klorofila. Mjerenjem apsorbancije na 633 i 645 nm te izračunavanjem ukupnih klorofila prema navedenoj formuli dolazi se do rezultata ukupnih pigmenata u klici pšenice izraženih u mg/100g.

$$\text{Ukupni klorofil (mg/100g)} = 7,15 \cdot A_{663} + 18,71 \cdot A_{645}$$

(prema Vayupharp, B., Laksanalamai, V., 2013)



Slika 12. Klice uzgojene Zimske pšenice nakon ekstrakcije u 80 % acetonu, neposredno prije izlaganja 5 minutnom procesu centrifugiranja (vlastita fotografija).

3.2.8. Određivanje fizikalno kemijskih parametara u destiliranoj i plazma aktiviranoj vodi

3.2.8.1. Određivanje pH - vrijednosti i električne vodljivosti

Određivanje pH - vrijednosti netretirane i plazma aktivirane vode provođeno je digitalnim pH metrom (HANNA instruments, Woonsocket, RI, SAD, elektroda HI11310).

Određivanje električne vodljivosti netretirane i plazma aktivirane vode provođeno je konduktometrom (HANNA instruments, Woonsocket, RI, SAD, elektroda HI763100). Oba

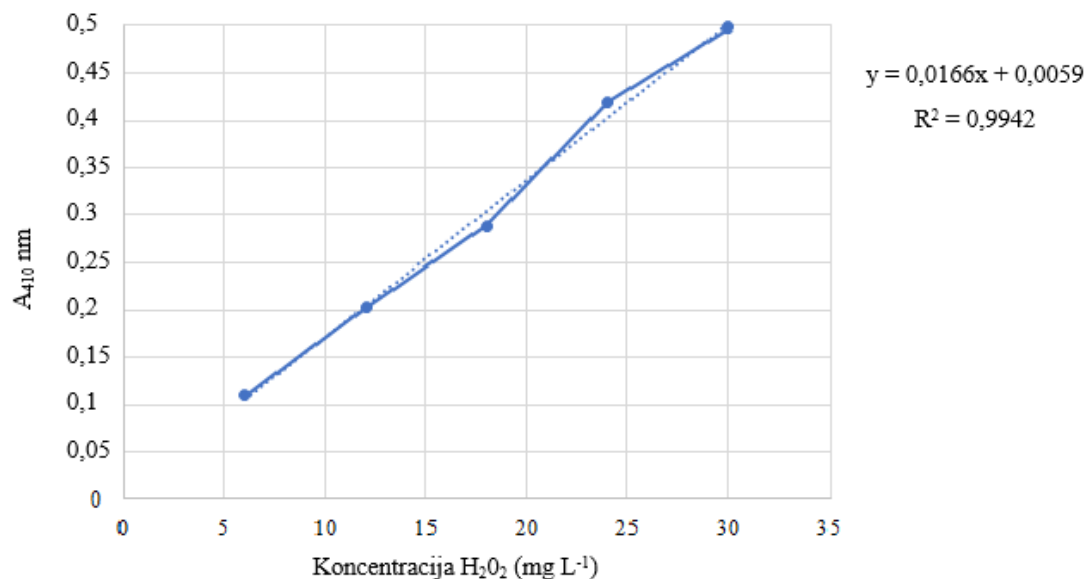
mjerenja su provođena uranjanjem kombinirane elektrode u uzorak te nakon stabilizacije očitanjem vrijednosti na zaslonu uređaja.

3.2.8.2. Određivanje temperature

Mjerenje temperature kao jednog od fizikalno kemijskih parametara provodilo se u netretiranoj i plazma aktiviranoj vodi pomoću digitalnog infracrvenog termometra (InfraRed Thermometer, PCEC-777, PCE Instruments, SAD). Mjerenje je provođeno direktnim pozicioniranjem termometra iznad uzorka te očitanjem temperature na zaslonu uređaja.

3.2.8.3. Određivanje koncentracije peroksida (H_2O_2)

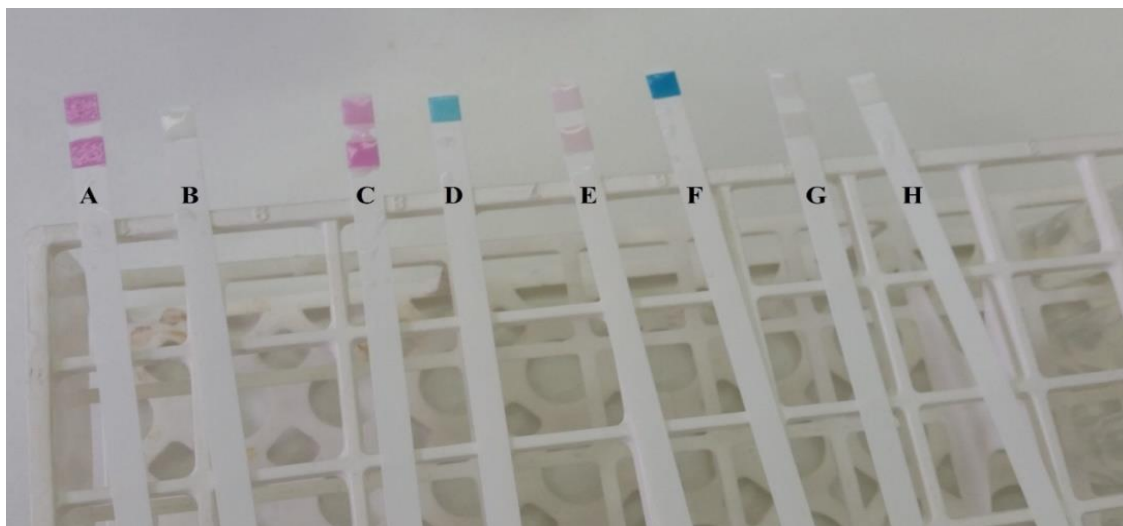
Nakon tretmana plazmom odredila se koncentracija vodikovog peroksida u plazma aktiviranoj vodi i to UV-Vis spektroskopijom pri 410 nm na ESR spektrometaru (E-109, Varian Inc., SAD). 1 mL pripremljenog titan reagensa (Sigma Aldrich, CAS: 13263-67-7) pomiješao se s 2 mL uzorka te se preko izrađenog baždarnog pravca vidljivog na, Slici 13., očitala koncentracija vodikovog peroksida. Vodikov peroksid neposredno nakon tretmana odredio se i preko listića (Quantofix Peroxyde 25, Macherey-Nagel Germany) uranjanjem neposredno nakon tretmana, Slika 16. Osim direktno nakon tretmana mjerenje koncentracije peroksida u plazma aktiviranoj vodi provodilo se i kroz 3 dana, također spektrofotometrijskom metodom pomoću titan reagensa prilikom čega su uzorci plazma aktivirane vode ovisno o tipu plina i pšenice skladišteni pri sobnoj temperaturi.



Slika 13. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji H₂O

3.2.8.4. Određivanje koncentracije NO₂, NO₃ u plazma aktiviranoj vodi

Neposredno nakon tretmana u plazma aktiviranoj vodi ovisno o tipu plina odredila se koncentracija NO₂, NO₃ prema metodi uranjanja indikatorskih listića (Quantofix Nitrate / Nitrite test strips, Macherey-Nagel Germany), na Slici 14. je prikaz korištenih listića prilikom mjerenja uz radne plinove: kisik, dušik, argon, zrak, analogno jačina boje označava dobivene vrijednosti.



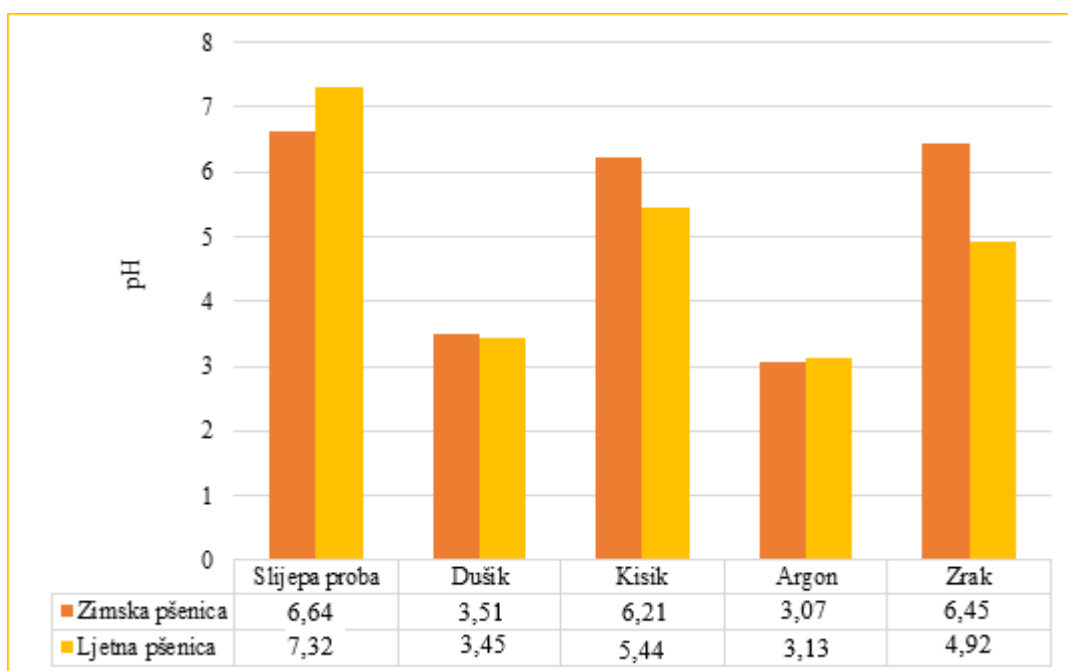
Slika 14. Prikaz listića (*Quantofix Peroxyde 25, Quantofix Nitrate / Nitrite test strips, Macherey-Nagel Germany*) neposredno nakon metode uranjanja u tretirani uzorak plazma aktivirane vode ovisno o plinu, sjeme koje je bilo u vodi prilikom tretmana je Ljetna pšenica; A) plin kisik mjerenje koncentracije H_2O_2 , B) plin kisik mjerenje koncentracije NO_2 , C) plin dušik mjerenje koncentracije H_2O_2 , D) plin dušik mjerenje koncentracije NO_2 , E) plin argon mjerenje koncentracije H_2O_2 , F) plin argon mjerenje koncentracije NO_2 , G) plin zrak mjerenje koncentracije H_2O_2 , H) plin zrak mjerenje koncentracije NO_2 (vlastita fotografija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA FIZIKALNO KEMIJSKA SVOJSTVA PLAZMOM AKTIVIRANE VODE

Na Slici 15. prikazane su pH - vrijednosti za destiliranu vodu u kojoj se nalazilo sjeme Ljetne i Zimske pšenice prije tretmana, te pH - vrijednost plazma aktivirane vode, ovisno o sjemenu prisutnom prilikom tretmana i radnom plinu korištenom prilikom tretmana.

U Tablici 2. su prikazane vrijednosti temperature i električne vodljivosti za destiliranu vodu (prije) i za plazma aktiviranu vodu (nakon) tretmana visokonaponskim pražnjenjem, ovisno o radnom plinu i tipu sjemena prisutnom prilikom provedenog tretmana.



Slika 15. Ovisnost pH – vrijednosti vode o tretmanu hladnom plazmom za obje pšenice.

Tablica 2. *Izmjerene vrijednosti fizikalno kemijskih parametara (električne vodljivosti i temperature) vode prije i nakon tretmana hladnom plazmom za obje vrste pšenice.*

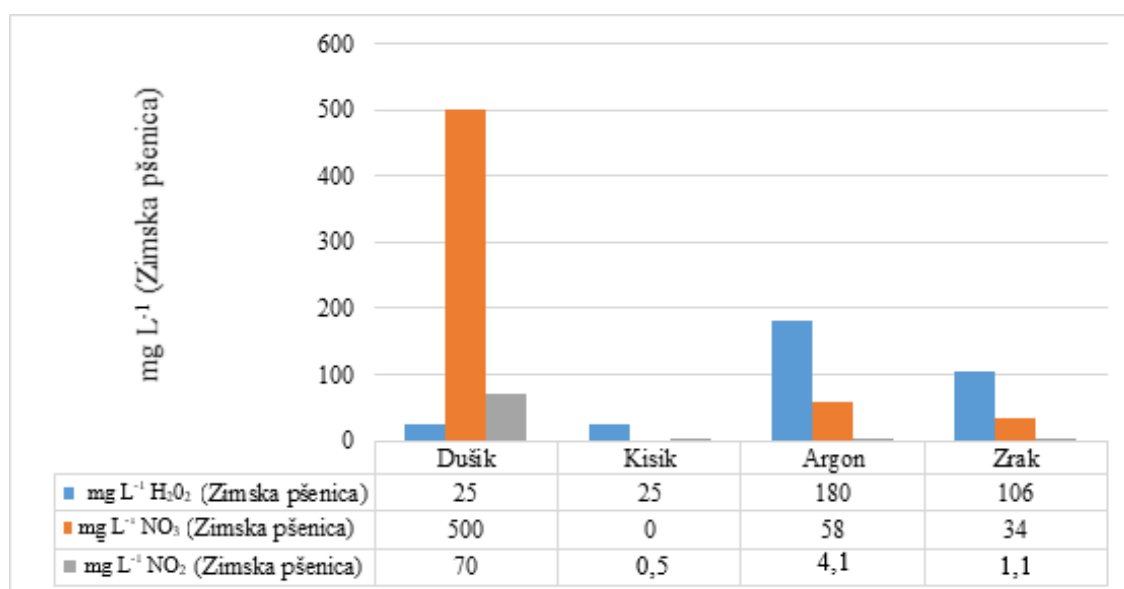
<i>Zimska pšenica</i>	Temperatura (°C)	Električna vodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
Slijepa proba	18,8	23,4
Dušik	40,2	177,4
Kisik	30,9	85,6
Argon	34,4	281,0
Zrak	32,3	78,2
<i>Ljetna pšenica</i>	Temperatura (°C)	Električna vodljivost ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
Slijepa proba	18,6	27,5
Dušik	32,7	122,2
Kisik	38,8	76,6
Argon	38,1	344,0
Zrak	31,3	79,5

Nakon tretmana plazmom došlo je do smanjenja pH - vrijednosti u uzorcima plazma aktivirane vode. Najveća pH - vrijednost u plazma aktiviranoj vodi (Zimska pšenica) je prilikom upotrebe Zrak kao radnog plina i pH - vrijednost iznosi 6,45 što je i dalje manje od vrijednosti destilirane vode (kontrolnog uzorka) u kojoj pH - vrijednost iznosi 6,64 (Slika 15.). Najniža pH - vrijednost (Zimska pšenica) dobivena je upotrebom Argona i iznosi 3,07 što je 2,16 puta manje u usporedbi s kontrolnim uzorkom (Slika 15.). Najveća pH-vrijednost u plazma aktiviranoj vodi (Ljetna pšenica) je prilikom upotrebe Kisika kao radnog plina i pH - vrijednost iznosi 5,44, što je 1,35 puta manje od kontrolnog uzorka (destilirane vode) kod koje pH - vrijednost iznosi 7,32 (Slika 15.) Električna vodljivost se u svim uzorcima (tipovima radnih plinova) nakon tretmana povećala, što korelira analogno s porastom temperature nakon tretmana (Tablica 2.). Izmjerene vrijednosti se kreću u rasponu od $76,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ do $344 \mu\text{S cm}^{-1}$ te su obrnuto proporcionalne porastu temperature, točnije uzorcima s najvećim povećanjem vrijednosti električne provodnosti pripadaju najmanje vrijednosti porasta temperature nakon tretmana (Tablica 2.). Pri vrijednostima električne vodljivosti od 150 do $3000 \mu\text{S cm}^{-1}$ smanjuje se stvaranje H_2O_2 u tekućini (Shih i Locke, 2010). Visoka vodljivost otopina kod plazme u mjehurićima rezultira visokom strujom pražnjenja, većom gustoćom elektrona, jačim UV zračenjem, te kraćom

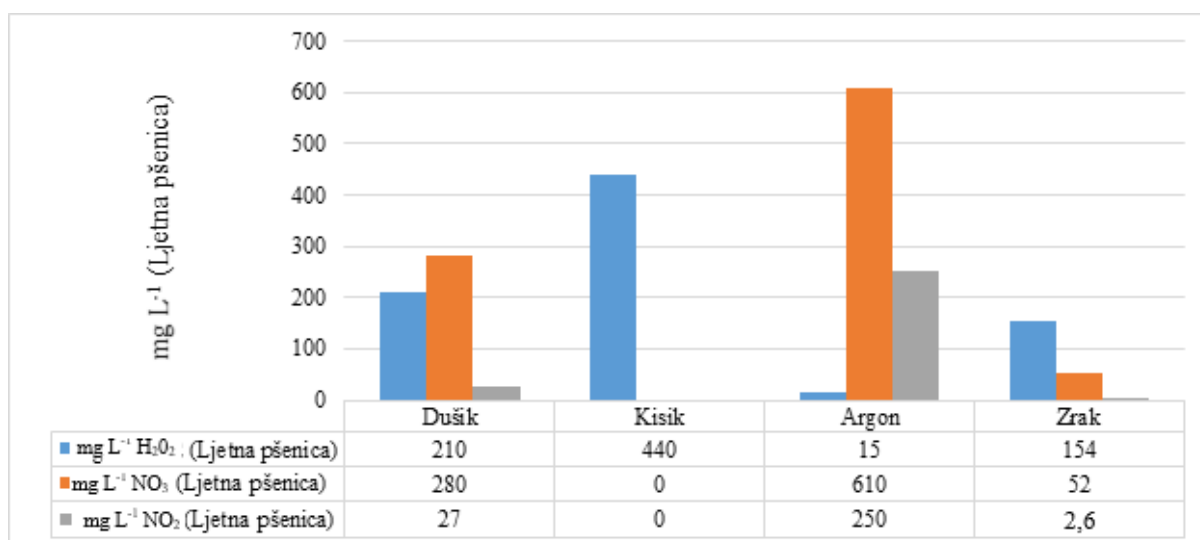
duljinom pulsa, što rezultira kraćim, ali sjajnijim izbojima vidljivim kod visoko vodljivih tekućina (Shih i Locke, 2010). Objašnjenje povećanja električne vodljivosti i smanjenja pH tretirane plazma aktivirane vode u usporedbi sa slijepom probom posljedica je prisutnosti nitritnih i nitratnih spojeva otopljenih u vodi koji nastaju kada se plinovi koji sadrže dušik izlože električnom pražnjenju. Dolazi do disocijacije molekule dušika na dušikove radikale, koji se uz prisustvo kisika i kisikovih radikala rekombiniraju i nastaju nitratni i nitritni spojevi (Jiang i sur., 2014).

4.2. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA NASTANAK RAKALNIH SPOJEVA U PLAZMA AKTIVIRANOJ VODI

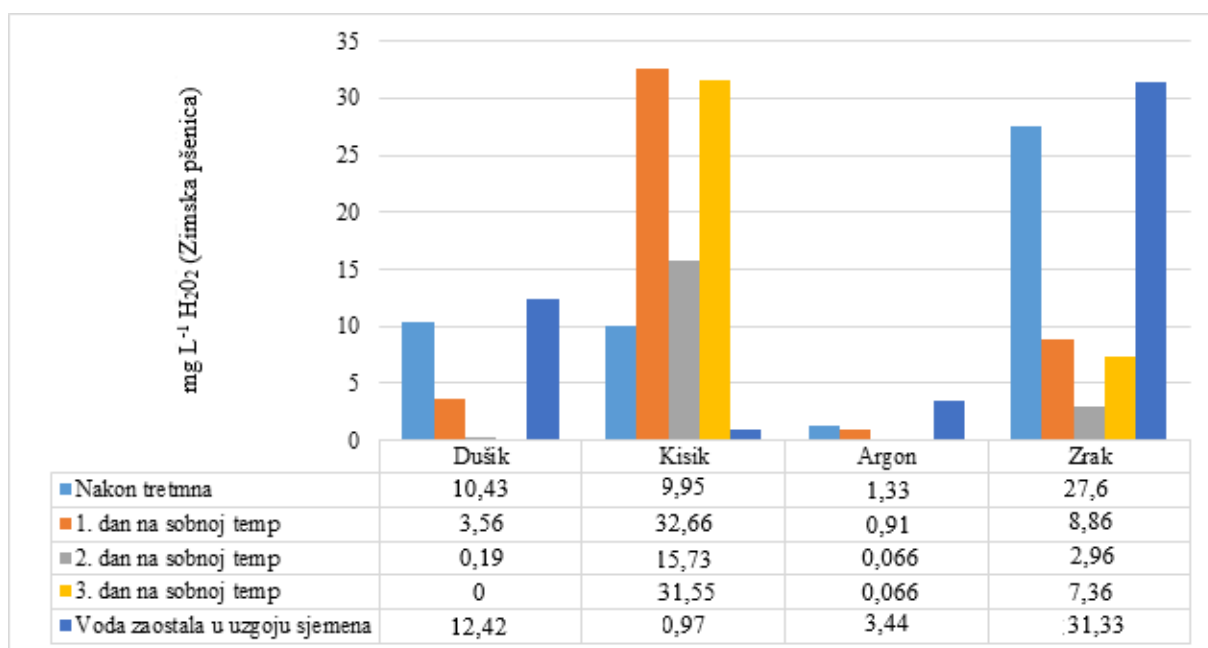
Na Slikama 16. i 17. prikazane su koncentracije peroksida, nitrita i nitrata mjerenih u plazma aktiviranoj vodi neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, mjerene metodom uranjanja listića, analogno na Slikama 18. i 19. prikazane su vrijednosti koncentracije peroksida mjerene spektrofotometrijski neposredno nakon tretmana, u vodi u uzgoju te praćenje kroz 3 dana plazma aktivirane vode skladištene na sobnoj temperaturi.



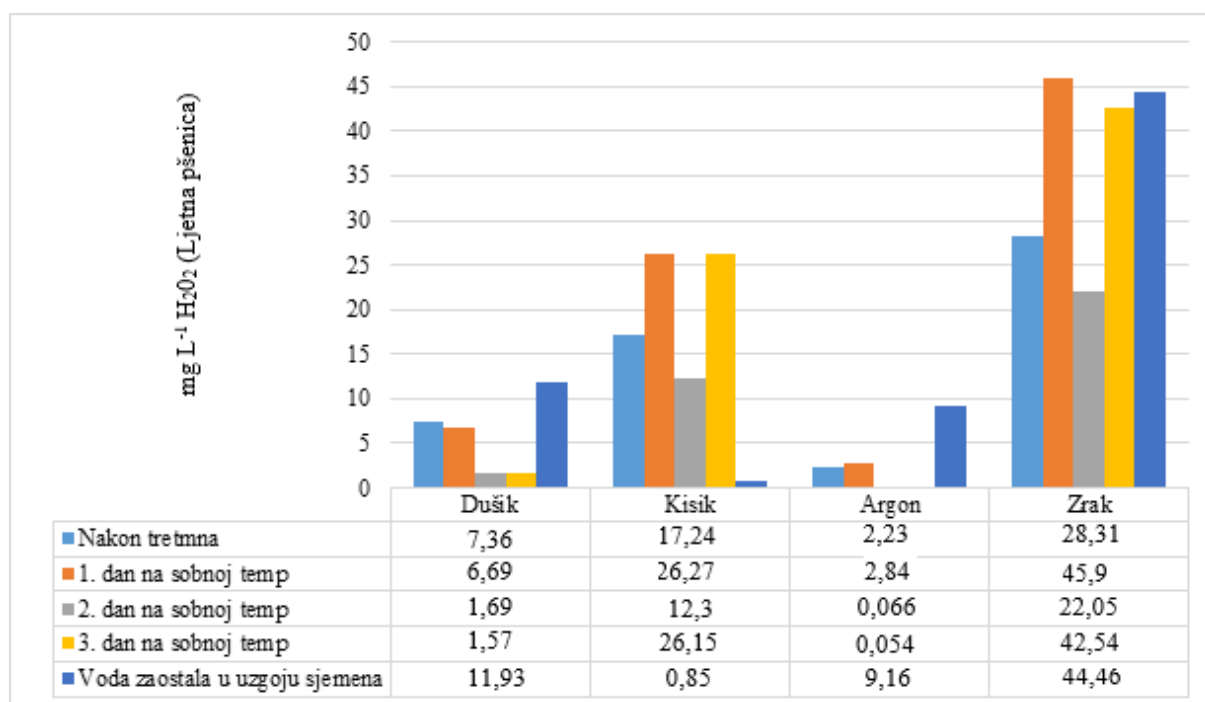
Slika 16. Prikaz koncentracija peroksida, nitrita, nitrata neposredno nakon tretmana plazmom (Zimska pšenica).



Slika 17. Prikaz koncentracija peroksida, nitrita, nitrata neposredno nakon tretmana plazmom (Ljetna pšenica).



Slika 18. Praćenje koncentracije H₂O₂ (mg L⁻¹) u plazma aktiviranoj vodi (Zimska pšenica) neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, kroz 3 dana skladištene vode na sobnoj temperature, te u vodi zaostaloj nakon inkubacije sjemena.



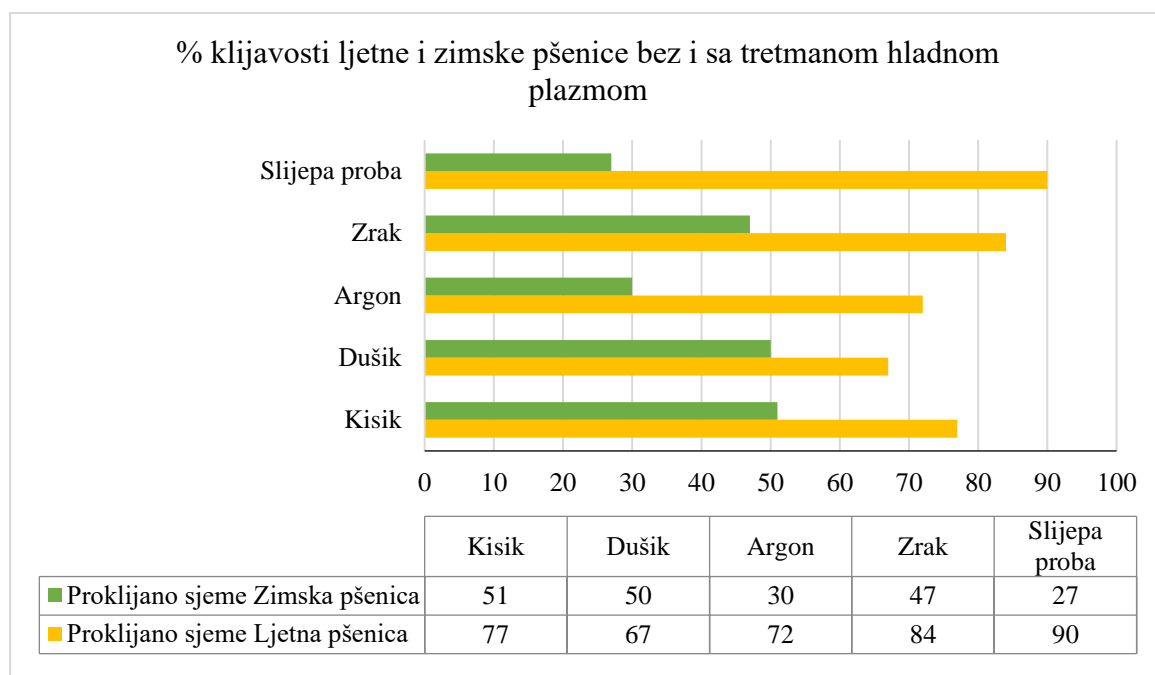
Slika 19. Praćenje koncentracije H_2O_2 (mg L^{-1}) u plazma aktiviranoj vodi (Ljetna pšenica) neposredno nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem, kroz 3 dana skladištene vode na sobnoj temperaturi, te u vodi zaostaloj nakon inkubacije sjemena.

Neposredno nakon tretmana u plazma aktiviranoj vodi primjenom radnog plina Zraka izmjerene su najviše koncentracije peroksida za oba uzorka; (Zimska pšenica $27,6 \text{ mg L}^{-1}$, Ljetna pšenica $28,31 \text{ mg L}^{-1}$) (Slika 18., 19.). Uočen je porast koncentracije peroksida u komparaciji s rezultatima neposredno nakon tretmana. Trostruko povećanje koncentracije vodikovog peroksida sa $9,95 \text{ mg L}^{-1}$ neposredno nakon tretmana, na $32,66 \text{ mg L}^{-1}$ nakon skladištenja jedan dan na sobnoj temperaturi (Zimska pšenica), (Slika 18., 19.). Skladištenjem vode na sobnoj temperaturi uočene su velike oscilacije u stabilnosti nastalog H_2O_2 . Primjenom ostalih radnih plinova dobivene vrijednosti padaju analogno danima skladištenja, te je uočen potpuni izostanak peroksida 3. dan skladištenja na sobnoj temperaturi primjenom radnog plina Dušika (Zimska pšenica), (Slika 18., 19.). Koncentracije peroksida u vodi zaostaloj tijekom uzgoja mogu se povezati s neposrednim upijanjem peroksida u sjemenku. Najveće izmjerene vrijednosti peroksida na plazma aktiviranoj vodi zaostaloj prilikom uzgoja su tretmanom plazmom u Zraku i iznose $31,33 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ (Zimska pšenica) te $44,46 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ (Ljetna pšenica), (Slika 18. i 19.). Rezultati upućuju da je sjeme prilikom prvih dana klijanja bilo izloženo visokoj koncentraciji peroksida, koja je utjecala na njegov rast i razvoj. Radikali H_2O_2 , O_3 , OH^\cdot , NO_3^\cdot , NO_2^\cdot , nastali visokonaponskim pražnjenjem dokazano imaju veći utjecaj na

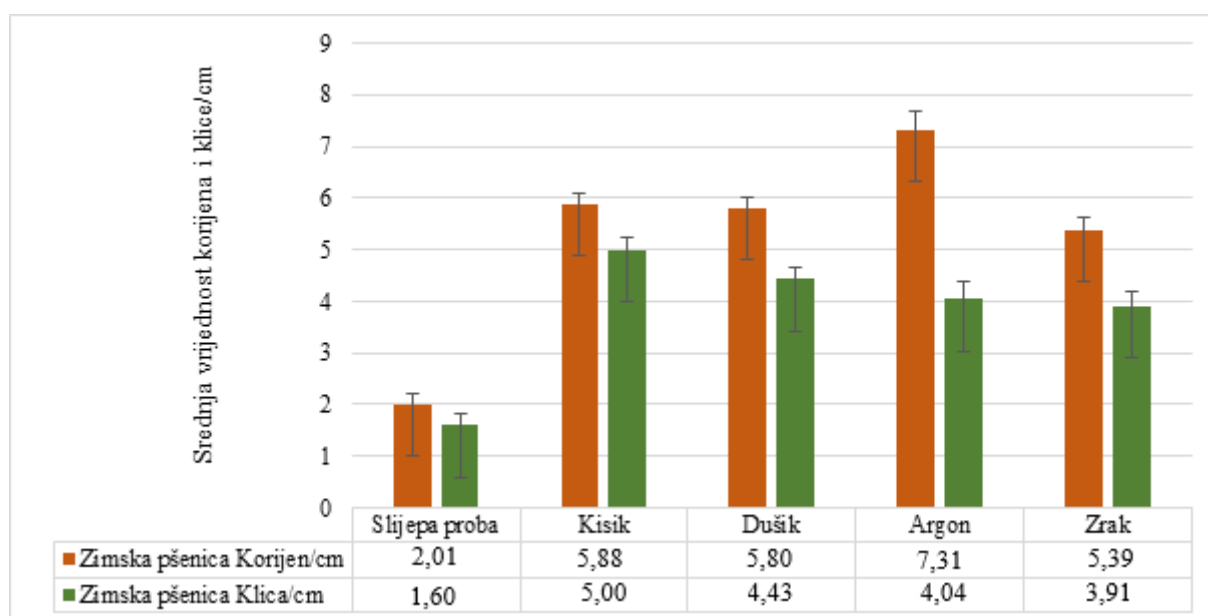
klijavost nego promjena pH - vrijednosti, koncentracija peroksida proporcionalna je rastu i razvoju korijena i klice. Na Slikama 16. i 17. prikazane su dobivene vrijednosti dušičnih spojeva u plazma aktiviranoj vodi. Najviše vrijednosti izmjerene su primjenom radnih plinova Dušika i Argona. Kod Zimske pšenice primjenom Dušika kao radnog plina izmjere su maksimalne vrijednosti koje iznose: $70 \text{ mg L}^{-1} \text{NO}_2^-$ te $500 \text{ mg L}^{-1} \text{NO}_3^-$. Porast koncentracije dušičnih spojeva uočen je primjenom radnog plina Argona kod uzoraka Ljetne pšenice, rezultati iznose $250 \text{ mg L}^{-1} \text{NO}_2^-$ te $610 \text{ mg L}^{-1} \text{NO}_3^-$. Povećanje električne vodljivosti i smanjenje pH - vrijednosti korelira s prisutnošću nitrita i nitrata u plazma aktiviranoj vodi (Hwang, Jeong, Jung., 2017).

4.3. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA RAST I RAZVOJ SJEMENA LJETNE I ZIMSKE PŠENICE

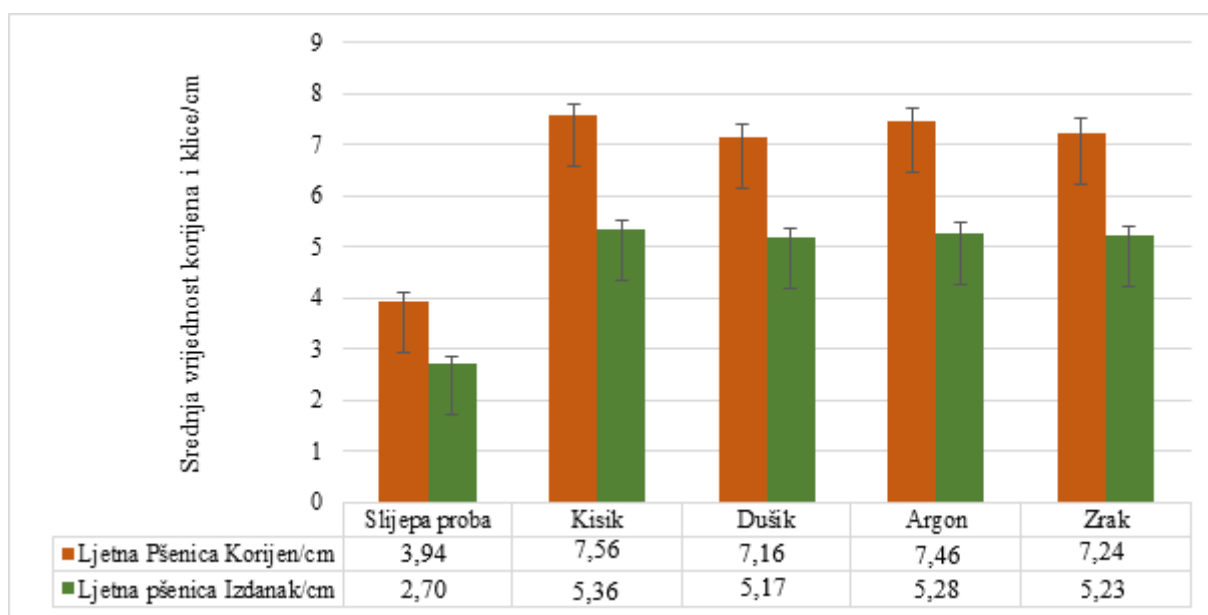
Na Slici 20. prikazan je utjecaj tretmana visokonaponskog pražnjenja na poticanje klijavosti Ljetne i Zimske pšenice, dok na Slikama 21. i 22. prikazan je utjecaj visokonaponsko pražnjenja na rast i razvoj korijena i klice sjemena Ljetne i Zimske pšenice. Optimalne temperature za poticanje procesa klijanja su između 15 i 20°C , a najveća 35°C . Najoptimalnija temperatura da bi se postigla klijavost je između 6 i 12°C . Osim temperaturnih uvjeta, potrebno je zadovoljiti potrebe za vodom (vlažnosti) (Nastić, 2014). Naši uzorci inkubirani su na 20°C , a potrebu za vlažnosti zadovoljavali smo upotrebom plazma aktivirane vode ovisno o tipu plina korištenog prilikom tretmana.



Slika 20. Postotak klijavosti Ljetne i Zimske pšenice bez i sa plazma tretmanom, ovisno o odabranom radnom plinu prilikom tretmana.



Slika 21. Prikaz srednjih vrijednosti korijena i klice nakon plazma tretmana i inkubacije 6 dana na 20 °C (Zimska pšenica)



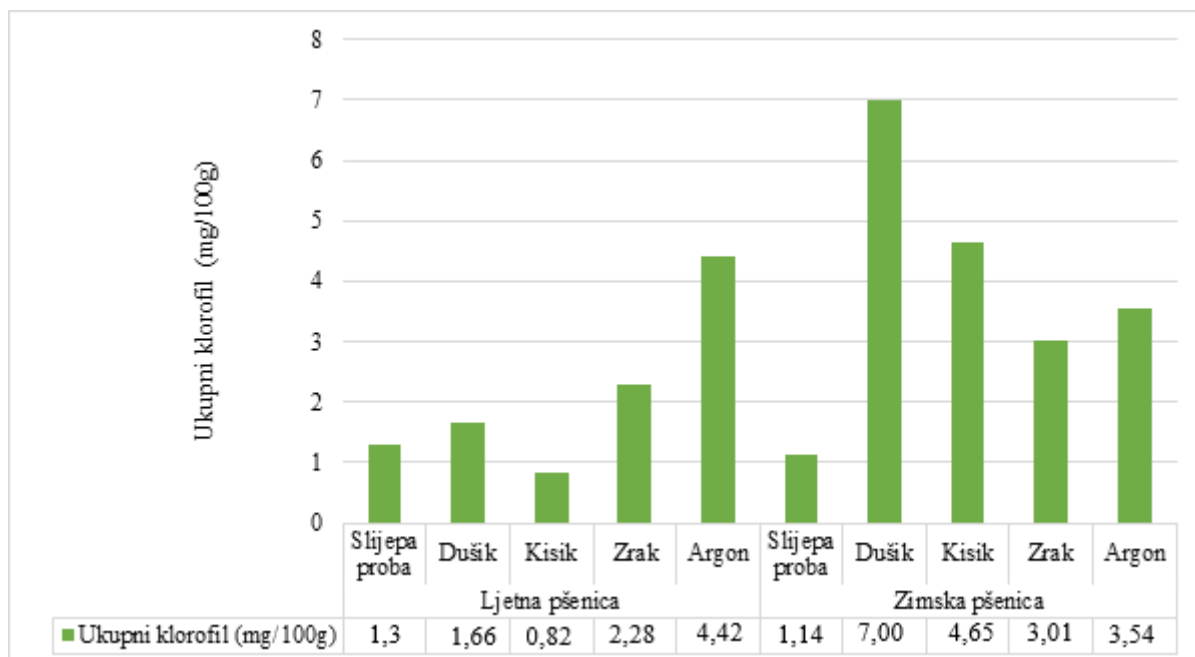
Slika 22. Prikaz srednjih vrijednosti korijena i klice nakon plazma tretmana i inkubacije 6 dana na 20 °C (Ljetna pšenica)

Slika 20. prikazuje utjecaj hladne plazme na poticanje klijavosti sjemena Ljetne i Zimske pšenice. Ljetnu pšenicu očituje izrazito bolja sposobnost klijanja, vidljiv je utjecaj dormantnosti na sjeme Zimske pšenice. Najveći postotak klijanja kod Zimske pšenice uočen je primjenom radnog plina Kisika (51 %), dok kod Ljetne pšenice primjenom radnog plina Zraka (84 %), (Slika 20.). Uz postotak klijavosti potrebno je pratiti i razvoj korijena i klice samog sjemena. Pogodno je da je korijen dugačak i dobro razvijen kako bi mogao obavljati svoje funkcije kao što su učvršćivanje biljke u tlu, upijanje vode i mineralnih tvari iz tla te služiti kao spremište rezervnih hranjivih tvari. Na Slikama 21. i 22. su srednje vrijednosti razvoja korijena i klice, za uzorke (Zimska i Ljetna pšenica), dobivene vrijednosti se značajno ne razlikuju, unatoč tome što Ozima (Zimska) pšenica klija sa 3 korjenčića, a jara (Ljetna) sa 5 korjenčića (Nastić, 2014). Uspoređujući kontrolni uzorak (slijepu probu) sa tretiranim uzorcima, bolji rezultati za srednje vrijednosti korijena i klice dobiveni su kod Zimske pšenice; korijen 3,64 puta veći (plin Argon, 7,31 cm, slijepa proba 2,01 cm), klica 3,31 puta veća (plin kisik 5,00 cm, slijepa proba 1,60 cm). Kod Ljetne pšenice rezultati su 2 puta veći prilikom tretmana radnim plinom Kisikom (korijen 7,56 cm, slijepa proba 3,94; klica 5,36 cm, slijepa proba 2,70 cm), (Slike 21., 22.). Primjena Kisika kao radnog plina pokazala se efikasna u poticanju rasta i razvoja oba tipa sjemena, što možemo povezati sa ranije spomenutom proizvodnjom peroksida. Rezultati klijavosti u korelaciji su s spektrofotometrijskim rezultatima koncentracije peroksida, kod Ljetne pšenice najviše koncentracije peroksida su uočene upravo primjenom Zraka (28,31 mg

L⁻¹), te Kisika (17,24 mg L⁻¹) (Slike 18., 19.) što možemo povezati upravo sa utjecajem peroksida na povećanje dobivenih vrijednosti (utjecaj na klijanje). Visokonaponsko pražnjenje dovodi do nastanka peroksida u plazma aktiviranoj vodi, što doprinosi rastu i razvoju klice. Nekolicina autora dokazala je da se rani stadij klijanja može potaknuti izlaganjem sjemena pšenice visokonaponskom pražnjenju (hladnoj plazmi). Kao razlog poboljšanja perioda klijavosti navode ulazak i direktno djelovanje radikala preko oslabljene površine u unutrašnjost sjemena. Utjecaj na klijavost najviše ima Kisik, koji ovim procesom direktno transmisijom ulazi u srž sjemena i olakšava razvitak. Prema Fridmanu (2008) interakcija sjemenih stanica s plazmom može uzrokovati denaturacijske promjene u DNA, gubitak stanične funkcije, promjenu strukturnih proteina te utjecajem na enzimske aktivnosti i smanjenih perioda dormancije pšenice. Sera i sur. u radu (2012) govore o periodu klijanja sjemena pšenice tretirane hladnom plazmom uz Zrak kao radni plin dolazi do značajno boljih rezultata u usporedbi sa netretiranim uzorkom pšenice. Sjeme uronjeno u vodu i izloženo visokonaponskom pražnjenju uz pomoć radnog plina zraka direktno je izloženo kisikovim radikalima koji značajno doprinose razvitku sjemena (Sivachandiran, Khacef., 2017). Plazma reagira sa sjemenom tako da mijenja njegove površinske karakteristike i stvara funkcionalne spojeve koji pozitivno djeluju na razvoj sjemena u cijelosti. Plazma tretman dovodi do promjena na epitelu sjemena i omogućava ulazak radikala u srž sjemena, njihovim ulaskom analogno potiče metabolički rast i razvoj (Lakshman K. Randeniya, Gerard J.J. B. de Groot, 2015). Nastali radikali H₂O₂, O₃, OH⁻, NO₃⁻, NO₂⁻ kontroliraju količinu ulaska potrebne vode za proces klijanja (Sivachandiran, Khacef, 2017).

4.4. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG PRAŽNJENJA NA RAZVOJ KLOROFILA U KLICI ZIMSKE I LJETNE PŠENICE

Analiza ukupno nastalog klorofila u klici Ljetne i Zimske pšenice podvrgnute tretmanu visokonaponskog pražnjenja prikazana je na Slici 23.



Slika 23. Količina ukupnih klorofila u klici sjemena Ljetne i Zimske pšenice bez i nakon plazma tretmana.

Na Slici 23. vidimo da kod Zimske pšenice upotrebom Dušika kao radnog plina prilikom visokonaponskog pražnjenja, te upotrebom Argona kao radnog plina kod Ljetne pšenice uočene su najviše vrijednosti količine ukupnih klorofila. Nije iznenađujuće jer dušik je sastavni dio klorofila i proteina, utječe na nastanak i sintezu kloroplasta te akumulaciju klorofila u kloroplastima (Ray Tucker, 2004). Osim toga dušik je esencijalni element za poticanje razvoja biljke i njegova količina je najbitniji sastav prirodnih hranjiva (Daughtry, 2000). Dobivene vrijednosti (Slika 23.) su kod Ljetne pšenice za Argon čak 3,4 puta veće u usporedbi s kontrolnim uzorkom, dok kod tretmana Zimske pšenice upotrebom Dušika vrijednosti u usporedbi sa slijepom probom su čak 6,14 puta veće. Oba plina (Dušik i Argon) pokazuju sličan način djelovanja kao kalcij oksid ili natrijev dihidrogen fosfat u radu Jašić (2013) utječu na očuvanje klorofila unatoč izloženosti nepovoljnom pH, te samim time štite nutritivna, senzorska i kvalitativna svojstva pšenice. Ukoliko bi se sjeme tretiralo s plazma aktiviranom vodom koja je aktivirana Dušikom ili Argonom kao radim plinom postigao bi se izvanredan prinos pšenice bez upotrebe umjetnih gnojiva, a samim time bi se očuvala količina ukupnih pigmenata, ne samo klorofila već i karotenoida čime bi se povećala vrijednost na tržištu tako proizvedene pšenice. Udio klorofila možemo povezati sa rastom biljke, što je veći stadij rasta to biljka sadrži više klorofila (Sato, 2018). Osim morfološkog stadija biljke, na udio klorofila i karotenoida utječe udio mineralnih soli prisutnih u hranjivu (uzgoju). Bojović i Stojanović u radu (2005)

govore o sjemenu (klici) pšenice koja je uzgojena u zemlji koja je prethodno podvrgnuta umjetnim poboljšivačima te odraz na količinski sastav klorofila i karotenoid, kako gnojidbom mineralnog segmenta možemo utjecati na pigmentski sastav. Autori ističu dobivene maksimalne vrijednosti ukupnog klorofila od 2,4 do 3,2 mg/100g uz korišteno dušično gnojivo prilikom uzgoja. U našem tretmanu primjenom hladne plazme kod uzorka Zimske pšenice uz radni plin Dušik dobili smo 2,5 puta veće količine klorofila (7 mg/100g). Također naše vrijednosti su veće i od uobičajenih graničnih vrijednosti količine klorofila (4 – 5 mg/100g) u listu pšenice. Zimskoj pšenici potrebna je velika količina mineralnih elemenata zbog vegetacijskih uvjeta (dormantnosti). Dormantnost zrna glavni je čimbenik za tolerantnost na prije žetveno proključavanje kod zrna pšenice (Šarčević i sur., 2000).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Prema dobivenim rezultatima i uspoređujući s dostupnim literaturnim izvorima uočen je pozitivan učinak na sjeme Ljetne i Zimske pšenice u poticanju germinacije nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem uz odabrane procesne parametre: frekvencija 90 Hz, vrijeme tretiranja 10 minuta, radni plin: argon, kisik, dušik, zrak.
- Nakon tretmana visokonaponskim pražnjenjem dolazi do smanjenja pH - vrijednosti te povećanja električne vodljivosti u nastaloj plazma aktiviranoj vodi.
- Električna vodljivost u svim uzorcima nakon tretmana u obrnuto proporcionalnom je odnosu s temperaturom. Izmjerene vrijednosti su u rasponu od $76,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ do $344 \mu\text{S cm}^{-1}$, analogno uzorci s najvećom vodljivošću posjeduju najmanju temperaturu.
- Porast temperature u plazma aktiviranoj vodi nakon tretmana uzrokovan je prijenosom vibracijsko translacijske energije nastale prilikom elastičnih i neelastičnih sudara elektrona i molekula.
- Najviše dobivene pH - vrijednosti su prilikom primjene ranog plina Zraka (Zimska pšenica) i Kisika (Ljetna pšenica), razlog je prisutnost nitritnih i nitratnih spojeva nastalih rekombinacijom dušikovih i kisikovih radikala.
- Primjena radnih plinova Kisika i Zraka pokazala se najefikasnija u poticanju germinacije pšenice. Najveći postotak klijavosti 51 % u Zimskoj pšenici uočen je primjenom radnog plina Kisika, dok kod Ljetne pšenice primjenom radnog plina Zraka postignuta je klijavost u vrijednosti od 84 %.
- Rezultati klijavosti u korelaciji su s razvojem peroksida u plazma aktiviranoj vodi nakon tretmana. Kod Ljetne pšenice najviše koncentracije peroksida u plazma aktiviranoj vodi uočene su primjenom Zraka ($28,31 \text{ mg L}^{-1}$) i Kisika ($17,24 \text{ mg L}^{-1}$), dok kod Zimske pšenice primjenom radnog plina Zraka ($27,6 \text{ mg L}^{-1}$). Povišena koncentracija peroksida primjenom navedenih plinova Kisika i Zraka utječe na poticanje klijavosti sjemena i smanjenje pH-vrijednosti u plazma aktiviranoj vodi.
- Visokonaponsko pražnjenje dovodi do nastanka radikala u plazma aktiviranoj vodi. Navedeni spojevi kontroliraju količinu ulaska potrebne vode za provedbu procesa germinacije sjemena pšenice.
- Prisutnost dušičnih spojeva utječe na fizikalno kemijske parametre nastale plazma aktivirane vode, dušik je esencijalni element neophodan za rast i razvoj biljke. Najviše vrijednosti dušičnih spojeva uočene su primjenom radnog plina Dušika $70 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_2$;

500 mg L⁻¹ NO₃⁻, (Zimska pšenica), te primjenom radnog plina Argona 250 mg L⁻¹ NO₂; 610 mg L⁻¹ NO₃⁻, (Ljetna pšenica), rezultati su u koleraciji s koncentracijom ukupnih klorofila u klici pšenice.

- Kod Zimske pšenice upotrebom Dušika kao radnog plina prilikom tretmana hladnom plazmom u usporedbi s kontrolnim uzorkom dobivene su 6,14 puta veće vrijednosti ukupnih klorofila, te upotrebom Argona kao radnog plina kod Ljetne pšenice rezultati su čak 3,4 puta veće u usporedbi s kontrolnim uzorkom.
- Plazma visokonaponsko pražnjenje učinkovito utječe na pšenicu, ubrzava proces klijanja, smanjuje dormanciju i nepoželjne procese koji vode prema propadaju sjemena.

6. LITERATURA

- Anonymus (2012) <<https://hr.wikipedia.org/wiki/Klorofil>>. Pristupljeno 20. srpnja 2018.
- Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., Mullen, van der, J. (2006) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim. acta B*. **57**, 609 – 658.
- Bojović, B., Stojanović, J. (2005) Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Arch. Biol. Sci.* **57**, 283-290.
- Bošković, A. (2018) Pšenična trava - još jedna šaka u zube industriji raka, *Novi svjetski poredak*, <<http://www.novi-svjetski-poredak.com/2013/09/06/izlijecio-rak-psenicnom-travom-prkoseci-savjetu-lijecnika-spasio-svoj-zivot/>>. Pristupljeno 21. srpnja 2018.
- Braithwaite, N.S.J. (2000) Introduction to gas discharges. *Plasma Sources Sci. Technol.* **9**, 517-527.
- Chu, P. K., Lu X. (2014) Low temperature plasma technology: Methods and applications, CRC Press – Taylor & Francis Group, London.
- Čunko, R., Ercegović Ražić, S. (2010/2011) Use of plasma Technology for modification of textiles, *Annual 2010/2011 of the Croatian Academy of Engineering*, 199-212.
- Daughtry, C. S. T., Walthall, C. L. Kim, M. S. Brown de Colstoun, E. McMurtrey, J. E. (2000) Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Remote Sensing of Environment* **74**, 229-239.
- Dahayal, M., Lee, S., Park, S. (2006) Effect of cold plasma on seed germination. *Vacuum*. **80**, 499.
- Fridman, A. (2008) Plasma chemistry. Cambridge Univ Press, New York.

Haboudane, D., Miller, J. R., Tremblay, N., Zarco-Tejada, P. J., Dextraze, L. (2002) Intergrated narrow-band vegetation indices for prediction of crop chlorophyll content for application to precision agriculture. *Remote Sensing of Environment*. **81**, 416-425.

Hamerli, P. (2004) Plasma aminofunctionalisation of polymeric membrane surfaces for tissue engineering applications, Dissertation, Univesity of Veszprem.

Hwang, Jeong, Jung. (2017) Water electrode plasma discharge to enhance the bacterial inactivation in water, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*.

Ilić, K. (2014) Tehnološki činitelji i ekonomski pokazatelji proizvodnje pšenice na obiteljskom gospodarstvu, Poljoprivredni fakultet Osijek.

Jašić, M. (2013) Biljni pigmenti, Kemija hrane, <<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/biljni-pigmenti#toc-biljni-pigmenti--boje-boje-u-vou-i-povru>>. Pristupljeno 21.srpnja 2018.

Jiafeng, J., Xin, H., Ling, L. (2014) Effects of cold plasma treatment on seeds germination and seedling, *Plasma Sci. Technology*. **16**, 54.

Jiang, B., Zheng, J., Qui, S., Wu, M., Zhang, Q., Yan, Z., Xue, Q. (2014) Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation, *Chem. Eng. J.* **236**, 348-368.

Krstulović, N., Labazan, I., Milošević, S. (2006) Study of Mn laser ablation in methane atmosphere. *Eur. Phys. D.* **37**, 209-215.

Labazan, I., Krstulović, N., Milošević, S. (2006) Laser vaporization of AlLiH₄ sample. *Chemical Physics Letters*. **428**, 13–17.

Lakshman K. Randeniya, Gerard J.J. B. de Groot. (2015) Non – Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits. *Plasma Process. Polym.* **12**, 608-623.

Milohnić, J. (1966) Određivanje klijavosti sjemena pšenice kod niskih temperatura u tlu (Cold test metoda), *Poljoprivredni-fakultet Zagreb*.

Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J. (2016) Plasma in Food and Agriculture. U: Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), *Academic Press*, London.

Mott-Smith, H. Jr., Langmuir, I. (1926) The theory of collectors in gaseous discharges, *Phys. Rev.* **28**, 727-763

Nastić Predrag. (2014) Pšenica, <<http://agronomija.rs/2014/psenica/>>. Pristupljeno 25. srpnja 2018.

Naturela.hr. (2012) Mlada zelena pšenica za zdravlje i vitalnost, <<http://www.naturala.hr/mlada-zelena-psenica-za-zdravlje-i-vitalnost/1020/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2018.

Pemen, A. J. M., Hoebe, W. F. L. M., van Ooij, P., Leenders, P. H. M. (2016) Plasma activated water, Patent No. WO2016096751.

Poljoprivredni fakultet Osijek, PFOS. (2004) Pšenica, <http://www.obz.hr/vanjski/CD_AGBASE2/HTM/psenica.htm> . Pristupljeno 26. srpnja 2018.

Ray Tucker, M. (2004) Primary nutrients and plant growth, In: Essential Plant Nutrients, *North Carolina Department of Agriculture*.

Sato, K. (2018) On the Chlorophyll Content of Barley Plant, *Japanese Journal of Crop Science*. 3-24.

Sera, B., Gajdova, I., Cernak, M. (2012) Seed germination and early growth. *Plasma Sci.* **238**, 1365.

Shih, K. Y., i Locke, B. R. (2010) Chemical and physical characteristics of pulsed electrical discharge within gas bubbles in aqueous solutions, *Plasma Chem. Plasma P.* **30**, 1-20

Sivachandiran. L, Khacef A. (2017) Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment, *RSC Advances*. **7**, 1822-1832.

Šarčević, H., Martinić – Jerčić, Z., Barić, M., Gunjača, J. (2000) Pre-Harvest Sprouting and Dormancy in Diverse Wheat Genotypes, *Agriculture Conspectus Scientificus*. Vol. 65, **2**, 115-121.

Tejada-Zarco, P. J., Miller, J. R., Morales, A., Berjon, A., Aquera, J. (2004) Hyperspectral indices and simulation models for chlorophyll estimation in open-canopy tree crops. *Remote Sensing of Environment*. **90**, 463-476.

Tendero, C., Tixier C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. acta B*. **61**, 2-30.

Tonks, L. (1967) The Birth of "Plasma". 407 Oakridge Drive, Schenectad, New York.

Vayupharp, B., Laksanalamai, V. (2013) Nutrients and anti-nutrients of high chlorophyll – mungbean sprouts as affected by different periods of germination and sprouting stages, *Int J Agric and Biol Eng*. Vol. 6 No.4 121-129.

Whitehead, J. C. (2016) The Chemistry of Cold Plasma. U: Cold Plasma in Food and Agriculture Fundamentals and Applications (Misra, N. N., Schlüter, O., Cullen, P. J., ured.), Academic Pres, London, str. 53-82.

Zang, S., Tian, S., Jiang, J., Han, D., Yu, X., Wang, K., Li, D., Lu, D., Yu, A., Zhang, Z. (2017) Determination of antioxidant capacity of diverse fruits by electron spin resonance (ESR) and UV–vis spectrometries. *Food Chem*. **221**, 1221–1225.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ime i prezime studenta